

Université de Montréal

**Modifications de l'expression génique du système nerveux central lors de l'insuffisance
hépatique aiguë : rôle dans les mécanismes pathophysiologiques responsables de
l'œdème cérébral.**

par
Mireille Bélanger

Département de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences Biomédicales

Juin, 2005
©Mireille Bélanger, 2005



W

4

U58

2006

V.053



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Modifications de l'expression génique du système nerveux central lors de l'insuffisance
hépatique aiguë : rôle dans les mécanismes pathophysiologiques responsables de
l'œdème cérébral.

présentée par :
Mireille Bélanger

a été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Blanchet

président-rapporteur

Roger F. Butterworth

directeur de recherche

Patrick Cossette

membre du jury

Samuel Lee

examineur externe

représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

L'encéphalopathie hépatique (EH) est un syndrome neuropsychiatrique survenant suite à une insuffisance hépatique chronique ou aiguë. Nos connaissances actuelles sur l'EH démontrent qu'il s'agit d'un désordre multifactoriel ne pouvant être expliqué par une cause unique. Il est intéressant de constater que des anomalies astrocytaires plutôt que neuronales sont observées lors de l'EH, tant dans sa forme chronique qu'aiguë. L'insuffisance hépatique aiguë (IHA) cause une augmentation rapide des taux d'ammoniaque sanguin et cérébral, accompagnée d'un œdème cérébral cytotoxique astrocytaire pouvant entraîner l'hypertension intracrânienne et causer une herniation cérébrale fatale.

Dans le cadre du présent projet, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'étude des changements d'expression de protéines clés du système nerveux central (SNC) pouvant participer à l'œdème cérébral lors de l'IHA.

Certaines études ont rapporté une baisse d'expression de la protéine glio-fibrillaire acide (GFAP) lors de l'EH chronique. Cependant, le rôle de cette protéine lors de l'EH aiguë n'a fait l'objet d'aucune étude. Dans l'article 1, nous avons démontré une diminution graduelle de l'expression de la GFAP suite à la dévascularisation hépatique. Des études démontrent qu'une perte de GFAP peut entraîner une susceptibilité accrue des astrocytes à un stress osmotique, possiblement suite à un changement de leurs propriétés visco-élastiques. À cet effet, il est intéressant de noter que la progression dans le temps de la perte d'expression de la GFAP présente une corrélation positive avec le contenu en eau du cerveau, une mesure de l'œdème cérébral.

Nous avons également démontré, dans l'article 2, une augmentation d'expression du récepteur des benzodiazépines de type périphérique (PTBR) lors de l'IHA chez le rat. Cette

augmentation de PTBR entraîne une hausse des sites de liaison de PTBR dans le cortex frontal et est accompagnée d'une augmentation des niveaux de pregnénolone, le précurseur pour la synthèse des neurostéroïdes, indiquant une possible implication de ces derniers lors de l'IHA.

L'article 3 rapporte une augmentation de l'expression du transporteur du glucose GLUT1 exprimé par les cellules endothéliales et astrocytaires du cerveau. Cette protéine est impliquée dans le transport du glucose à la barrière hémato-encéphalique. L'augmentation de GLUT1 est accompagnée d'une hausse de la capture cérébrale du glucose, suggérant une anomalie du métabolisme énergétique lors de l'IHA. De plus, l'exposition de cultures primaires d'astrocytes à des concentrations pathophysiologiques d'ammoniaque résulte également en une augmentation de l'utilisation du glucose.

L'étude de l'implication des changements d'expression protéiques *in vivo* lors de l'IHA serait facilitée par l'utilisation de souris transgéniques ou « knock-out ». Cependant, de telles études sont limitées par l'absence d'un modèle adéquat d'IHA chez la souris. Nous avons donc également entrepris de caractériser un modèle d'IHA causée par l'azoxyméthane, une toxine hépatique, chez la souris (article 4).

En bref, ce projet consiste en une étude des changements d'expression du SNC lors de l'IHA. Ces changements d'expression sont majoritairement astrocytaires et semblent être impliqués dans les mécanismes responsables de l'apparition de l'œdème cérébral. Une meilleure compréhension des causes et des conséquences de ces changements d'expression est nécessaire à l'élucidation des mécanismes responsables de l'œdème cérébral lors de l'IHA.

MOTS CLÉS

Encéphalopathie hépatique

Dévascularisation hépatique

Ammoniaque

Astrocyte

Œdème cérébral

Hypothermie

Protéine glio-fibrillaire acide

Récepteur des benzodiazépines de type périphérique

Transporteur du glucose

Azoxyméthane

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric syndrome occurring as a result of chronic or acute liver failure. In both cases, HE is a multifactorial disorder involving astrocytic rather than neuronal changes. Acute liver failure (ALF) causes rapid increases in blood and brain ammonia levels, resulting in cytotoxic swelling of the astrocytes which may cause intracranial hypertension and brain herniation, a major cause of death in ALF patients.

In the present thesis, we studied alterations in the expression of central nervous system (CNS) proteins occurring as a result of ALF in rats. The pathophysiological consequences of these changes of expression on cerebral function were also investigated, and in particular, their implications in the mechanisms responsible for brain edema.

Previous studies reported decreased expression of the glial-fibrillary acidic protein (GFAP) in chronic HE. The role of GFAP in ALF, however, is unknown. In article No. 1, we report a gradual decrease of GFAP expression following hepatic devascularization. It has been shown that decreased levels of GFAP results in increased astrocytic swelling following an osmotic stress, possibly because of altered visco-elastic properties of the astrocytes. In this respect, we observed that the progressive loss of expression of GFAP was positively correlated with brain water content, a measure of cerebral edema.

In article No. 2, we report that the expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor (PTBR) increases as a result of ALF in rats. PTBR up-regulation results in increased PTBR binding site densities in the frontal cortex, together with elevated levels of brain pregnenolone, the precursor of all neurosteroids synthesized in the brain. Increasing

evidence suggests that these neurosteroids are implicated in HE and brain edema occurring as a result of liver failure.

In article No. 3, we demonstrate that ALF results in increased expression of GLUT1, a facilitative glucose transporter expressed by astrocytes and capillary endothelial cells, where it mediated glucose transport across the blood-brain barrier. GLUT1 up-regulation is accompanied by an elevation of glucose uptake by the brain, adding to the growing body of evidence suggesting that ALF causes alterations of brain energy metabolism. Ammonia may be implicated since exposure of cultured astrocytes to ammonia results in increased GLUT1 expression and glucose utilization.

In order to efficiently study the consequences of these alterations of gene expression in ALF *in vivo*, the use of genetically manipulated animals (transgenics, knockouts) would be extremely valuable. Such studies have so far been limited by the lack of an appropriate model of ALF in mice. In article No. 4, we therefore undertook the neurological characterization of a mouse model of ALF caused by the hepatotoxic drug azoxymethane.

In conclusion, this thesis consists of a study of the alterations of gene expression in the CNS occurring as a result of ALF. Most of these changes selectively affect the astrocytes and may contribute to the swelling of this cell type observed in ALF. A better understanding of causes and consequences of these changes in gene expression in ALF is necessary for a better understanding of the mechanisms responsible for brain edema in ALF.

KEYWORDS

Hepatic encephalopathy

Hepatic devascularization

Ammonia

Astrocyte

Cerebral edema

Hypothermia

Glio-fibrillary acidic protein

Peripheral-type benzodiazepine receptor

Glucose transporter

Azoxymethane

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xvi
REMERCIEMENTS	xviii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1. L'encéphalopathie hépatique	2
1.1 L'encéphalopathie porto-systémique	2
1.2 L'encéphalopathie hépatique associée à l'insuffisance hépatique aiguë	3
1.3 L'insuffisance hépatique : neuropathologie	5
1.3.1 Propriétés et fonctions normales des astrocytes	5
1.3.2 Changements neuropathologiques associés à l'encéphalopathie porto-systémique	10
1.3.3 Changements neuropathologiques associés à l'encéphalopathie hépatique aiguë	12
2. Modèles animaux d'insuffisance hépatique aiguë	13
2.1 Modèles chirurgicaux d'IHA	14
2.1.1 Hépatectomie complète	14
2.1.2 Hépatectomie partielle	14
2.1.3 Dévascularisation hépatique complète	15
2.1.4 Dévascularisation transitoire	16
2.2 Modèles hépatotoxiques d'IHA	17
2.2.1 Acétaminophène	17
2.2.2 Galactosamine	18

2.2.3 Thioacétamide	18
2.3 Modèles infectieux d'IHA.....	19
3. Patophysiologie de l'œdème cérébral et de l'encéphalopathie hépatique associés à l'IHA	20
3.1 L'ammoniaque	20
3.1.1 Métabolisme de l'ammoniaque	21
3.1.2 L'ammoniaque dans l'IHA	23
3.2 Autres toxines en provenance de la périphérie	25
3.2.1 Oxindole.....	25
3.2.2 Benzodiazépines.....	26
3.3 L'œdème cérébral.....	27
3.3.1 Effet osmotique de la glutamine	28
3.3.2 Dérangements hémodynamiques	29
3.4 Altérations du métabolisme énergétique lors de l'IHA.....	32
3.4.1 Métabolisme énergétique cérébral	32
3.4.2 Dérangements du métabolisme énergétique lors de l'IHA	33
3.5 Altérations de la barrière hémato-encéphalique lors de l'IHA	35
3.6 Modifications des concentrations plasmatiques d'acides aminés lors de l'IHA	36
4. Modifications de l'expression génique du système nerveux central associées à l'insuffisance hépatique aiguë.....	37
4.1 EAAT-2.....	38
4.2 Récepteurs du glutamate	38
4.3 Glyt1.....	39
4.4 Transporteur/récepteur de la sérotonine.....	40
4.5 Transporteur/récepteurs de la noradrénaline.....	40

4.6 Récepteur des benzodiazépines de type périphérique (PTBR)	41
4.7 Aquaporine-4.....	43
5. Traitements de l'insuffisance hépatique aiguë	44
5.1 Transplantation hépatique	44
5.2 Réduction des niveaux plasmatiques d'ammoniaque	45
5.2.1 Lactulose	45
5.2.2 L-ornithine L-aspartate.....	45
5.3 Mannitol	46
5.4 Normalisation des paramètres hémodynamiques cérébraux	46
5.4.1 Hyperventilation.....	47
5.4.2 Thiopental de sodium.....	47
5.4.3 Indométhacine	47
5.5 Contrôle de la réponse inflammatoire systémique	47
5.6 Foie artificiel et bioartificiel.....	48
5.7 Hypothermie.....	49
5.7.1 Effets protecteurs sur la fonction cérébrale.....	49
5.7.2 Effets protecteurs sur la fonction hépatique.....	50
6. Buts de l'étude proposée	52
CHAPITRE 2 :	53
PARTIE 1 : MODIFICATIONS DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DU SYSTÈME	
NERVEUX CENTRAL LORS DE L'INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGÜE.....	53
Article 1: Loss of Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein in Acute	
Hyperammonemia	54

Article 2: Mild hypothermia prevents brain edema and attenuates up-regulation of the astrocytic benzodiazepine receptor in experimental acute liver failure	72
Article 3: Selectively increased expression of the astrocytic/endothelial glucose transporter protein GLUT1 in acute liver failure	93
PARTIE 2 : CARACTÉRISATION DU MODÈLE D'INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGÜE CAUSÉE PAR L'AZOXYMÉTHANE CHEZ LA SOURIS.....	
118	
Article 4 : Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure	119
CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE	142
1. Anomalies de la fonction astrocytaire associées à l'IHA.....	143
1.1 La protéine glio-fibrillaire acide (GFAP)	146
1.1.1 Modification de l'expression de la GFAP lors de l'insuffisance hépatique	146
1.1.2 Facteurs modifiant l'expression de la GFAP	147
1.1.3 Conséquences d'une perte d'expression de la GFAP	148
1.2 Le récepteur des benzodiazépines de type périphérique (PTBR)	151
1.2.1 Modification de l'expression de PTBR lors de l'insuffisance hépatique	151
1.2.2 Facteurs modifiant l'expression de PTBR	153
1.2.3 Conséquences d'une induction de l'expression de PTBR.....	155
1.3 Le transporteur facilitatif du glucose GLUT1	158
1.3.1 Modification de l'expression de GLUT1 lors de l'insuffisance hépatique aiguë.....	158
1.3.2 Facteurs modifiant l'expression de GLUT1	160
1.3.3 Conséquences d'une induction de l'expression de GLUT1	162

2.4 Rôle de l'ammoniaque dans les changements de l'expression génique associés à l'IHA	165
2.1 Limitations des modèles expérimentaux d'IHA chez la souris.....	169
2.2 Critères importants pour un modèle d'IHA destiné à des études de neurobiologie moléculaire.....	170
2.3 Caractérisation du modèle d'IHA induite par l'azoxyméthane chez la souris	171
CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS.....	176
CHAPITRE 5: SOMMAIRE	180
RÉFÉRENCES.....	184

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1.1 : Caractéristiques d'un modèle idéal d'insuffisance hépatique aiguë

Tableau 1.2 : Isoformes de la famille des transporteurs du glucose exprimés dans le SNC

Tableau 1.3 : Effets de l'hypothermie légère lors de l'IHA

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

Table 1: Brain water content in rats with ALF resulting from hepatic devascularization compared to sham-operated controls

ARTICLE 3

Table 1: Primer sequences used for RT-PCR

Table 2: [^{14}C]2-deoxy-D-glucose uptake by brains of rats with acute liver failure

ARTICLE 4

Table 1: Plasma amino acids concentration in AOM-induced acute liver failure

Table 2: Frontal cortex amino acids concentration in AOM-induced acute liver failure

CHAPITRE 3

Tableau 3.1 : Changements d'expression causés par l'ammoniaque dans les cultures d'astrocytes

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

- Figure 1.1 : Étiologie de l'insuffisance hépatique aiguë aux États-Unis entre 1998 et 2001
- Figure 1.2 : Changements neuropathologiques astrocytaires caractéristiques associés à l'insuffisance hépatique
- Figure 1.3 : Altérations de l'expression de l'ARNm dans le cortex frontal de rats ayant une IHA causée par la dévascularisation hépatique
- Figure 1.4 : Représentation schématique de la structure du récepteur aux benzodiazépines de type périphérique (PTBR)

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

- Figure 1: Decreased expression of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) mRNA in the brains of rats with acute liver failure
- Figure 2: Expression of S-100 β mRNA in the brains of rats with acute liver failure.
- Figure 3: GFAP protein expression in the brains of rats with acute liver failure

ARTICLE 2

- Figure 1: Brain water content in rats with ALF due to hepatic devascularization compared to sham-operated controls
- Figure 2: Increased expression of IBP in the cerebral cortex of rats with ALF due to hepatic devascularization

Figure 3: [³H]PK11195 binding site densities in the cerebral cortices of ALF due to hepatic devascularization

Figure 4: Pregnenolone concentration in the cerebral cortices of ALF rats due to hepatic devascularization

ARTICLE 3

Figure 1: Increased expression of glucose transporter (GLUT1) mRNA in the brains of rats with acute liver failure

Figure 2: mRNA expression of the glucose-regulated proteins (GRP) 78 and 94 in the brains of rats with acute liver failure

Figure 3: Increased protein expression of the 45 kDa and 55 kDa forms of GLUT1 in the brains of rats with acute liver failure

Figure 4: Representative immunohistochemical staining of GLUT1 in the frontal cortex of a sham-operated rat compared to a rat with ischemic liver failure at coma stage of encephalopathy

Figure 5: Increased expression of GLUT-1 (45 kDa) in primary cultured astrocytes exposed to 5 mM NH₄Cl for 1 day

ARTICLE 4

Figure 1: Liver histopathology in C57Bl mice treated with AOM (100 µg/g)

Figure 2: Effects of AOM-induced acute liver failure on blood and brain ammonia levels

Figure 3: Brain water content in AOM-treated mice compared to control mice

CHAPITRE 3

Figure 3.1 : Relation négative entre le niveau d'expression de la GFAP et l'œdème cérébral dans le cerveau de rats ayant une IHA

Figure 3.2 : Voies de synthèse des neurostéroïdes

Figure 3.3 : Schéma représentant les événements pouvant résulter d'une induction de GLUT1 lors de l'IHA causée par la dévascularisation hépatique

CHAPITRE 5

Figure 5.1 : Rôle des altérations de l'expression génique dans l'apparition de l'œdème cérébral lors de l'IHA causée par la dévascularisation hépatique chez le rat

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α KGDH	Complexe de l' α -cétooglutarate déshydrogénase
AAA	Acides aminés aromatiques
AACR	Acides aminés à chaîne ramifiée
ALT	Alanine transaminase
AMPA	acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolopropionique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANC	Canal du nucléotide adénine (« Adenine nucleotide channel »)
AOM	Azoxyméthane
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AST	Aspartate transaminase
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hémato-encéphalique
DBI	Inhibiteur de la liaison du diazépam (« Diazepam binding inhibitor »)
DHEA	Déshydroépiandrostérone
DHEAS	Déshydroépiandrostérone sulfate
EAAT1	Transporteur d'acide aminé exciteur 1 (« Excitatory amino acid transporter 1 »)
EAAT2	Transporteur d'acide aminé exciteur 2 (« Excitatory amino acid transporter 2 »)
EH	Encéphalopathie hépatique
EPS	Encéphalopathie porto-systémique
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GAT	Transporteur du GABA (« Gamma-aminobutyric acid transporter »)
GFAP	Protéine glio-fibrillaire acide (« Glial fibrillary acidic protein »)
GLUT	Transporteur du glucose
Glyt1	Transporteur de la glycine 1
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique

GRP	Protéines régulées par le glucose (« Glucose-regulated proteins »)
GS	Glutamine synthétase
IBP	« Isoquinoline carboximide binding protein »
IHA	Insuffisance hépatique aiguë
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDH	Lactate déshydrogénase
MAPK	« Mitogen activated protein kinase »
MARS	« Molecular Adsorbents Recirculating System »
MPT	Transition de la perméabilité mitochondriale (« mitochondrial permeability transition »)
MSO	Methionine sulfoximine
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	Oxyde nitrique
PAM	Pression artérielle moyenne
PC	Pyruvate carboxylase
PKA	Protéine kinase A
PPC	Pression de perfusion cérébrale
PS	Pregnénolone sulfate
PTBR	Récepteur des benzodiazépines de type périphérique (« Peripheral-type benzodiazepine receptor »)
RT-PCR	« Reverse transcription – polymerase chain reaction »
SNC	Système nerveux central
THDOC	Tétrahydrodéoxycorticostérone
THP	Tétrahydroprogestérone
TIPS	Anastomose porto-cave intrahépatique par voie trans-jugulaire (« Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt »)
VDAC	Canal anionique voltage-dépendant (« Voltage-dependent anion channel »)

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord exprimer mes plus sincères remerciements à mon directeur, le Dr Roger Butterworth pour ses conseils, sa patience et ses encouragements. Il m'a permis de mener mes études dans un climat stimulant et valorisant. Un merci tout particulier, Roger, pour ta confiance en moi au fil des ans.

Je voudrais aussi remercier tout le monde au Centre de recherche de l'Hôpital Saint-Luc pour m'avoir permis de travailler dans un climat si agréable. Merci en particulier à mes collègues et amis: d'abord à Paul Desjardins pour son aide, ses conseils et son infinie patience (je crois bien que je les ai toutes faites au moins une fois) et à Nicolas Chatauret, le plus gentil « maudit français » que je connaisse...merci beaucoup pour ton aide avec les chirurgies et tout le reste, merci aussi à Helen Chan, Raquel Herrero, Darren Navarro, Christopher Rose, Dominique Roy, Javier Vaquero, Samir Ahboucha, Claudia Zwingmann, Marie-Hélène Beaudet, Sandra Francis, Alan Hazell et John Yi.

Un gros merci à ma famille, en particulier à mes parents Josée et Gilles Bélanger pour leur soutien et leur compréhension. Merci à François, Denise et Antoine et Olivier qui me forcent à aller au Mexique de temps en temps. Merci aussi à mes amis : Mélissa, Geneviève, Stephen et tout particulièrement à Julie et France dont l'amitié m'est si précieuse. Je n'aurais pas pu atteindre mes objectifs sans votre appui à tous.

Merci aux Instituts de Recherche en Santé du Canada et aux Fonds de Recherche en Santé du Québec pour leur soutien financier.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1. L'encéphalopathie hépatique

L'encéphalopathie hépatique (EH) est un syndrome neuropsychiatrique sérieux survenant suite à une insuffisance hépatique. Bien que nos connaissances actuelles sur l'EH suggèrent qu'il s'agit d'un désordre multifactoriel ne pouvant être expliqué par une cause unique, il est généralement admis que l'accumulation de substances normalement éliminées par le système hépato-biliaire qui ont un effet toxique au niveau du système nerveux central (SNC) (par exemple, l'ammoniaque et le manganèse) contribue de façon importante au développement des complications neurologiques associées à l'insuffisance hépatique. L'EH se présente sous deux principales formes se distinguant par la sévérité et la progression de la maladie hépatique, soient l'encéphalopathie porto-systémique (EPS) et l'EH associée à l'insuffisance hépatique aiguë (IHA).

1.1 L'encéphalopathie porto-systémique

L'EPS survient le plus souvent suite à une cirrhose du foie lors de laquelle l'hypertension portale peut entraîner la formation spontanée de vaisseaux sanguins collatéraux entre la circulation portale et la circulation systémique. D'autre part, l'insertion chirurgicale d'un TIPS (« Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt ») visant à réduire l'hypertension portale en créant une dérivation porto-systémique de la circulation sanguine peut également mener au développement de l'EPS. Dans les deux cas, la présence d'un shunt porto-systémique a pour effet de réduire la quantité de sang atteignant le foie en provenance de la veine porte et cause ainsi une accumulation de toxines dans la circulation sanguine.

Les symptômes neurologiques associés à l'EPS se manifestent de façon graduelle et, dépendant de leur sévérité, on classe traditionnellement l'encéphalopathie sur une échelle

de quatre grades. Aux stades précoces de l'encéphalopathie, on observe entre autres une légère confusion, de l'irritabilité et des anomalies du cycle du sommeil (grade 1) progressant vers un état caractérisé par l'apathie, la somnolence et la désorientation (grade 2). Aux stades plus avancés, il y a présence de confusion, de délire et de stupeur (grade 3) pouvant évoluer vers un état de coma (grade 4) (Adams et Foley, 2004). L'EPS peut également être accompagnée de troubles du mouvement caractéristiques d'une atteinte extrapyramidale tels la bradikynésie, les tremblements et la rigidité (Spahr et al., 1996). Il est intéressant de noter qu'avec la mise au point de nouvelles techniques plus sensibles d'imagerie par résonance magnétique, un nombre grandissant d'études rapportent la présence d'un œdème cérébral léger dans les stades précoces de l'EPS. En effet, ces études démontrent que des patients cirrhotiques atteints d'EPS subclinique, c'est-à-dire ne démontrant que des anomalies très subtiles des fonctions cognitives et motrices, présentent un œdème cérébral léger (« low grade ») en corrélation positive avec les niveaux cérébraux de glutamine et de glutamate (Rovira et al., 2001; Cordoba et al., 2001). Comme nous le verrons plus tard, cela n'est pas sans rappeler l'œdème cérébral potentiellement fatal associé à l'IHA et reflète possiblement l'existence de mécanismes communs affectant le cerveau dans les deux formes de dysfonction hépatique.

1.2 L'encéphalopathie hépatique associée à l'insuffisance hépatique aiguë

L'IHA est définie cliniquement comme la détérioration rapide des fonctions hépatiques, résultant en l'apparition de symptômes de l'encéphalopathie dans les huit semaines suivant les premiers signes de jaunisse chez un patient n'ayant pas d'antécédents de maladies du foie (Trey et Davidson, 1970). Différentes étiologies peuvent être à l'origine de l'IHA (Figure 1.1). Dans la plupart des pays occidentaux (Europe et Amérique

du Nord) la grande majorité des cas d'IHA est due à la toxicité hépatique liée à la prise de médicaments. En particulier, l'intoxication causée par l'acétaminophène (qu'elle soit accidentelle ou associée à des intentions suicidaires) est la cause la plus fréquente d'IHA; on lui attribue jusqu'à 70 % des cas en Angleterre (Bernal, 2003). D'autres atteintes hépatiques dont l'hépatite A, l'hépatite B, l'hépatite auto-immune ou encore l'intoxication causée par l'ingestion de champignons toxiques (par exemple l'amanite phalloïde) peuvent également être à l'origine de l'IHA, mais ne sont responsables que d'un faible pourcentage des cas (Lee, 2003).

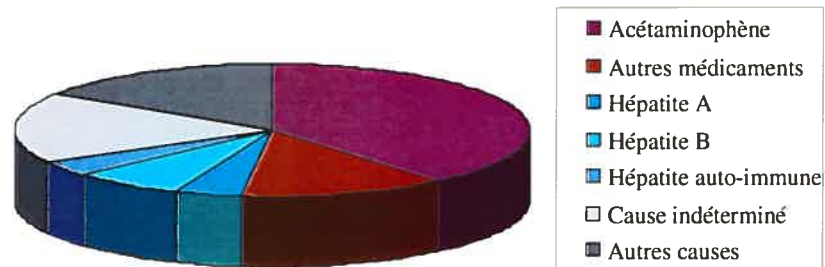


Figure 1.1 Étiologie de l'insuffisance hépatique aiguë aux États-Unis entre 1998 et 2001 (données adaptées de (Ostapowicz et al., 2002)).

L'IHA est une condition très sérieuse pouvant progresser rapidement. Dans l'impossibilité de procéder à une transplantation hépatique, le taux de mortalité se situe entre 40 % et 80 % (Gill et Sterling, 2001). Ceci est en grande partie dû aux nombreuses complications associées à l'IHA parmi lesquelles on retrouve l'instabilité hémodynamique, l'hypoglycémie, la coagulopathie, l'insuffisance rénale, la susceptibilité accrue aux infections et la défaillance multi-organique. Au niveau du SNC les complications associées à l'IHA sont l'encéphalopathie hépatique et l'œdème cérébral. Contrairement à l'EPS, l'encéphalopathie hépatique associée à l'IHA évolue rapidement, se manifestant d'abord

par de légers changements de l'état mental qui progressent vers un état de stupeur et enfin de coma dans un délai de quelques jours seulement. D'autre part, l'œdème cérébral est certainement l'une des complications les plus sérieuses de l'IHA puisqu'il peut se traduire par une augmentation de la pression intracrânienne qui, si elle suffisamment importante, peut causer une herniation cérébrale, une importante cause de mortalité lors de l'IHA.

1.3 L'insuffisance hépatique : neuropathologie

D'un point de vue neuropathologique, l'insuffisance hépatique, tant dans sa forme chronique qu'aiguë, est caractérisée par des anomalies astrocytaires plutôt que neuronales. Avant d'aborder les anomalies astrocytaires propres à l'insuffisance hépatique, la section suivante décrit brièvement quelques unes des fonctions normalement remplies par les astrocytes dans le SNC.

1.3.1 Propriétés et fonctions normales des astrocytes

1.3.1.1 Classification et morphologie

Les astrocytes composent environ 40 % du nombre total de cellules du SNC et jouent un rôle de première importance dans le développement et la fonction du SNC (Wolff et al., 2004). Ils sont traditionnellement classés en deux principaux types, fibrillaire et protoplasmiques, bien que cette classification soit parfois considérée comme artificielle (Raine, 1999). Les astrocytes protoplasmiques sont localisés dans la matière grise et possèdent de nombreux prolongements cytoplasmiques très ramifiés, alors que les astrocytes fibrillaire, présents dans la matière blanche, possèdent de longs prolongements formant peu de branches (Levison et Goldman, 1993).

Les prolongements astrocytaires occupent une grande partie de l'espace du SNC et enveloppent les éléments synaptiques ainsi que les corps cellulaires des neurones. D'autre

part, les astrocytes envoient également des prolongements cytoplasmiques appelés pieds périvasculaires qui recouvrent la presque totalité des capillaires sanguins et occupent par le fait même une position centrale entre l'apport nutritif sanguin et les neurones. Des prolongements astrocytaires recouvrent également la membrane basale apposée contre la pie-mère, couche méningée interne, formant une couche appelée la glie limitante (Burkitt et al., 1993).

1.3.1.2 Marqueurs

De nombreux marqueurs spécifiques aux astrocytes sont utilisés afin de faciliter l'identification de ce type cellulaire. Parmi ces marqueurs, on trouve la protéine gliofibrillaire acide (GFAP), la protéine S100 β , les enzymes glutamine synthétase (GS) et glutathion S-transférase Yb (Levison et Goldman, 1993), ainsi que les transporteurs du glutamate EAAT1 et EAAT2 (Danbolt, 2001).

Le marqueur astrocytaire le plus utilisé est sans doute la GFAP, dont la régulation à la hausse est caractéristique de la gliose réactionnelle. La GFAP (50 kDa) est une protéine du cytosquelette appartenant aux filaments intermédiaires de type III. Chaque sous-unité de GFAP est composée d'une hélice α flanquée de chaque côté par des domaines C-terminal et N-terminal non-hélicoïdaux possédant six sites de phosphorylation (Rodnight et al., 1997). L'assemblage des monomères solubles de la GFAP en filaments dont le diamètre est d'environ 10 nm constitue un processus extrêmement dynamique, fortement influencé par le niveau de phosphorylation des sous-unités de GFAP (Rodnight et al., 1997). La GFAP joue un rôle important, entre autres, dans le maintien de la structure astrocytaire, dans la résistance du SNC aux stress mécaniques (Nawashiro et al., 1998), dans la régulation du volume astrocytaire (Ding et al., 1998) et dans l'établissement de la dépression à long terme

dans le cervelet (Shibuki et al., 1996). L'importance de la GFAP dans la fonction normale du SNC est illustrée par le fait que des mutations du gène de la GFAP sont à l'origine de la maladie d'Alexander, un désordre neurodégénératif fatal où l'on observe des agrégats protéiques cytoplasmiques riches en GFAP appelés fibres de Rosenthal (Johnson et Brenner, 2003).

1.3.1.3 Fonctions des astrocytes

D'abord considérées comme de simples cellules de soutien, il est maintenant devenu évident que les astrocytes sont impliqués dans plusieurs fonctions importantes du SNC. Avant d'aborder plus en détail quelques-unes de ces fonctions, mentionnons d'abord que les astrocytes participent au guidage des cellules neuronales en migration, dans la gliose réactionnelle et la défense immunitaire du SNC (en association avec la microglie) (Aschner, 1998), dans la protection contre le stress oxydatif via la production de glutathion (Dringen et al., 2000), dans la stéroïdogénèse (Papadopoulos et al., 1998), dans l'osmorégulation (Walz, 1989) et dans la détoxification de l'ammoniaque cérébral (Butterworth, 2002).

i) Rôle de soutien de la neurotransmission

Les astrocytes sont impliqués dans plusieurs étapes de la neurotransmission. D'une part, ils participent à la recapture des neurotransmetteurs suite à leur relâche à la synapse, un mécanisme important pour la terminaison de la transmission synaptique. Les astrocytes possèdent en effet deux transporteurs du glutamate, EAAT1 et EAAT2, qui sont les principaux responsables de la recapture synaptique de ce dernier (Danbolt, 2001), une fonction primordiale afin d'éviter l'excitotoxicité causée par le glutamate (Sattler et Tymianski, 2001). Le transporteur neuronal du glutamate, EAAT3 est situé à l'extérieur de

la synapse et joue quant à lui un rôle marginal dans la recapture du glutamate (Danbolt, 2001). D'autre part, en collaboration avec les neurones, les astrocytes participent également à la recapture du GABA, le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, grâce aux transporteurs GAT 1, GAT 2 et GAT 4 (Schousboe et Waagepetersen H.S., 2004).

Les astrocytes jouent également un rôle important dans la synthèse des neurotransmetteurs en fournissant aux neurones les précurseurs qui leur sont nécessaires. Par exemple, une fois dans l'astrocyte, le glutamate est converti en glutamine par l'action de la GS. La glutamine est ensuite transportée dans les neurones où la glutaminase la reconvertit en glutamate (Hertz et al., 1999a). Ce mécanisme, appelé cycle glutamate - glutamine, est primordial à la régénération des stocks de glutamate disponibles pour la neurotransmission et dépend en grande partie des astrocytes puisqu'ils sont responsables de la recapture du glutamate et sont les seuls à exprimer la GS (Hertz et al., 1999b).

D'autre part, lors de la propagation d'un influx nerveux, les neurones relâchent d'importantes quantités de K^+ dans un milieu extracellulaire restreint ce qui, en l'absence d'un mécanisme compensatoire, pourrait affecter le potentiel membranaire et rendre les neurones hyperexcitables (Walz, 2004). Les astrocytes accomplissent cependant un tamponnage spatial du K^+ , c'est-à-dire qu'ils accumulent le K^+ dans les régions de haute activité et qu'ils permettent sa diffusion à travers le syncytium astrocytaire vers des régions de concentration moindre où le K^+ est relâché (Walz, 2004), permettant de conserver des concentrations extracellulaires de K^+ relativement constantes.

ii) Rôle de support du métabolisme énergétique cérébral

Les astrocytes participent de plusieurs façons au métabolisme énergétique cérébral. Tout d'abord, les nombreux granules de glycogène qu'ils contiennent constituent la plus

importante réserve d'énergie du SNC (Magistretti et al., 1993). Ce glycogène est une réserve dynamique dont le métabolisme est régulé par certains neurotransmetteurs dont la noradrénaline et la sérotonine, permettant ainsi d'appuyer la demande énergétique nécessaire à l'activité neuronale (Magistretti et al., 1993).

D'autre part, les dernières années ont vu émerger une nouvelle théorie selon laquelle les astrocytes jouent un rôle central dans le couplage de l'activité neuronale avec l'utilisation du glucose. Selon cette théorie, le transport du glutamate dans les astrocytes active la glycolyse, déclenchant une hausse de l'utilisation du glucose et une production accrue de lactate (Voutsinos-Porche et al., 2003). L'ajout de ouabaine inhibe complètement cet effet (Pellerin et Magistretti, 1997), suggérant que cette utilisation astrocytaire du glucose est secondaire à l'activation de la Na^+/K^+ ATPase, dont la sous-unité $\alpha 2$ est par ailleurs distribuée similairement aux transporteurs du glutamate EAAT1 et 2 sur les astrocytes péri-synaptiques (Cholet et al., 2002). Selon cette théorie, le lactate serait ensuite transporté vers les neurones où il pourrait fournir jusqu'à 17 molécules d'ATP suite à sa conversion en pyruvate par l'enzyme LDH 1 et son entrée dans le cycle de Krebs (Magistretti et Pellerin, 1999).

En troisième lieu, d'autres études laissent penser que les astrocytes jouent aussi un rôle dans le couplage spatial et temporel du flot sanguin cérébral avec l'activité neuronale. En effet, une étude par Zonta et collègues (2003) effectuée dans des tranches de cortex de rat démontre que le glutamate relâché lors de l'activité neuronale cause une augmentation de la concentration cytoplasmique astrocytaire de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) suite à une activation des récepteurs métabotropiques du glutamate. L'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimule le métabolisme de l'acide arachidonique, provoquant ensuite la sécrétion de substances

vasodilatatrices, possiblement des prostaglandines (Zonta et al., 2003) ou l'acide époxyeicosatrienoïque (Harder et al., 1998), par les pieds périvasculaires astrocytaires, augmentant le flot sanguin cérébral. La mise en évidence d'un tel mécanisme astrocytaire n'exclue cependant pas l'implication des neurones dans la relâche d'autres substances vasoactives tels l'oxyde nitrique, le K^+ ou le lactate, qui peuvent également contribuer à coupler l'activité neuronale et le flot sanguin cérébral.

iii) rôle dans l'induction et le maintien de la barrière hémato-encéphalique

De nombreuses études *in vitro* suggèrent un rôle des astrocytes dans l'induction et le maintien des propriétés de la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, lorsque des cellules endothéliales sont mises en culture en présence d'astrocytes ou de milieu de culture conditionné par des astrocytes, on observe une augmentation de la formation de jonctions étanches (« tight junctions ») (Arthur et al., 1987; Tao-Cheng et al., 1987), une augmentation de l'expression de plusieurs transporteurs spécifiques de la BHE (Bauer et Bauer, 2000), et une hausse de la résistance électrique transendothéliale (Rubin et al., 1991). La confirmation de l'existence de tels mécanismes *in vivo* s'est toutefois révélée très difficile à réaliser et fait toujours l'objet d'un débat (Bauer et Bauer, 2000).

1.3.2 Changements neuropathologiques associés à l'encéphalopathie porto-systémique

Lors de l'EPS, certains astrocytes, particulièrement au niveau du cortex cérébral et des ganglions de la base, subissent un ensemble de changements morphologiques que l'on nomme astrocytose Alzheimer de type II (Butterworth, 1998). Ces changements furent décrits pour la première fois par Von Hosselin et Alzheimer (1912) et sont caractérisés par un élargissement et une pâleur du noyau, la présence d'un nucléole bien visible, et une

marginalisation de la chromatine (Figure 1.2A) (Butterworth, 1998). Ces astrocytes sont fréquemment observés en paires et incorporent de façon importante la thymidine tritiée, suggérant une activité mitotique élevée chez ces cellules (Brumback et Lapham, 1989). Les astrocytes Alzheimer de type II subissent également des changements moléculaires caractérisés par une perte d'expression de la GFAP, une protéine du cytosquelette astrocytaire qui, comme nous l'avons mentionné précédemment, est couramment utilisée comme marqueur spécifique pour ce type cellulaire (Sobel et al., 1981). De plus, l'astrocytose Alzheimer de type II semble être impliquée dans l'induction d'un récepteur impliqué dans la synthèse des neurostéroïdes, le récepteur des benzodiazépines de type périphérique (PTBR), dans le cerveau de patients souffrant d'encéphalopathie hépatique chronique, puisqu'on observe une augmentation de l'expression de PTBR en fonction de la présence d'astrocytes Alzheimer de type II confirmée par un examen histopathologique *post-mortem* (Bélanger et al., 2003). Les causes exactes de l'astrocytose Alzheimer de type II ne sont pas connues, mais il semble que l'ammoniaque et/ou le manganèse, deux toxines qui s'accumulent dans le sang en raison de la dysfonction hépatique, soient impliquées. En effet, une astrocytose Alzheimer de type II est présente dans d'autres situations caractérisées par une hyperammoniémie (par exemple, les désordres congénitaux du cycle de l'urée (Dolman et al., 1988), l'anastomose porto-cave (Diemer et Tonnesen, 1977) et les cultures d'astrocytes exposées à l'ammoniaque (Norenberg, 1981)) ou encore suite à une intoxication au manganèse (Normandin et Hazell, 2002).

Bien qu'une atteinte neuronale ne soit généralement pas associée à l'EH, dans de rares cas particulièrement sévères, l'EH chronique peut entraîner une pathologie appelée dégénérescence hépatocérébrale acquise non-wilsonienne. Celle-ci est caractérisée par une

dégénération des neurones des ganglions de la base et du cervelet donnant au cerveau un aspect spongiforme (Lee et al., 1998; Felipe et Butterworth, 2002).

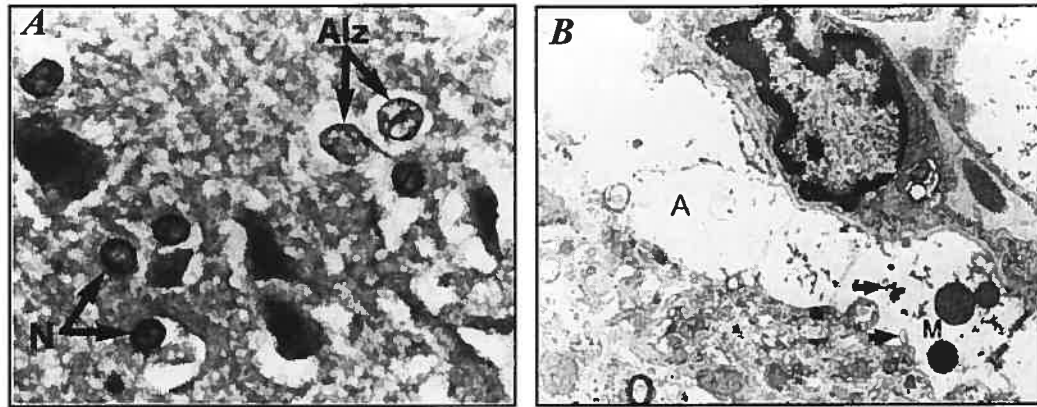


Figure 1.2 Changements neuropathologiques astrocytaires caractéristiques associés à l'insuffisance hépatique

A) Astrocytose Alzheimer de type II dans le cortex préfrontal d'un patient cirrhotique décédé en coma hépatique. N : noyaux normaux, Alz : astrocytes alzheimer de type II

B) Œdème cytotoxique d'un astrocyte péri-vasculaire d'une patiente décédée suite à une insuffisance hépatique aiguë causée par une intoxication à l'acétaminophène. A : Astrocyte, M : Mitochondries (Kato et al., 1992).

1.3.3 Changements neuropathologiques associés à l'encéphalopathie hépatique aiguë

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, l'œdème cérébral peut entraîner une augmentation de la pression intracrânienne et causer une herniation cérébrale, une importante cause de décès dû à l'IHA. L'examen *post-mortem* par microscopie électronique du cerveau de patients décédés suite à une IHA démontre un œdème cérébral cytotoxique localisé au niveau des astrocytes (Kato et al., 1992). Les astrocytes périvasculaires présentent en effet un aspect très gonflé, accompagné d'une dilatation du réticulum endoplasmique et d'un gonflement des mitochondries (Kato et al., 1992). Comme nous le verrons en détail plus loin, l'ensemble de nos connaissances actuelles indiquent que l'œdème cytotoxique astrocytaire ne peut être expliqué par un mécanisme unique et semble plutôt être le résultant d'un ensemble de facteurs agissant de concert.

Puisque les données expérimentales faisant l'objet de cette thèse portent sur la forme aiguë de l'insuffisance hépatique, les prochaines sections mettront l'accent sur celle-ci plutôt que sur l'EPS.

2. Modèles animaux d'insuffisance hépatique aiguë

Différentes approches peuvent être adoptées dans le but de produire un modèle expérimental d'IHA. Les deux principales catégories de modèles animaux d'IHA sont les modèles chirurgicaux et les modèles de toxicité hépatique. Six critères définissant le modèle idéal d'IHA ont été proposés par Terblanche et Hickman (1991) et constituent toujours la norme pour l'évaluation des modèles d'IHA. Ces critères sont résumés dans le Tableau 1.1.

Tableau 1.1 Caractéristiques d'un modèle idéal d'insuffisance hépatique aiguë

Critère	Explication
Réversibilité	L'insuffisance hépatique devrait être potentiellement réversible afin d'être en mesure d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements sur la survie
Reproductibilité	Sans traitement, l'IHA devrait causer la mort chez presque tous les animaux
Mort causée par l'IHA	La mort devrait survenir suite à un coma hépatique dans un délai semblable à celui observé en clinique
Fenêtre thérapeutique	La mort devrait survenir dans un délai suffisamment long pour permettre l'administration et l'évaluation d'un traitement
Grande espèce animale	De grands animaux permettent de nombreux prélèvements et sont mieux adaptés pour le test de traitements applicables à l'homme
Danger minimal pour le personnel	La méthode utilisée devrait comporter un minimum de risque pour le personnel de laboratoire

2.1 Modèles chirurgicaux d'IHA

2.1.1 Hépatectomie complète

Des modèles animaux d'IHA faisant appel à l'ablation chirurgicale complète du foie ont été développés chez plusieurs espèces dont le rat (Rozga et al., 1992; Olafsson et al., 1995; Azoulay et al., 1997), le lapin (Nyberg et al., 1996), le chien (Starzl et al., 1959; Daloze et al., 1990) et le cochon (Hickman et al., 1974; Filipponi et al., 1999; Fruhauf et al., 2004). Dans leur ensemble, ces modèles ont de nombreux désavantages. Tout d'abord, la progression des symptômes présente peu de points communs avec la situation observée chez des patients ayant une IHA. En effet, les anomalies biochimiques et neurologiques associées à l'IHA n'arrivent que 2 à 4 heures avant la mort et la durée du coma est très courte (Newsome et al., 2000). De plus, ces modèles ne respectent pas le critère de réversibilité, ce qui limite leur utilisation pour l'évaluation de nouvelles avenues thérapeutiques pour le traitement de l'IHA. Un autre désavantage important des modèles d'hépatectomie complète est l'absence du foie nécrotique *in situ* qui peut contribuer aux symptômes de l'IHA en relâchant des substances toxiques ou des cytokines pro-inflammatoires (Ringe et al., 1993; Rozga et al., 1993; Jalan et al., 2002b).

2.1.2 Hépatectomie partielle

Différents modèles d'ablation partielle du foie (entre 70 et 95 % de la masse hépatique) ont été décrits chez le rat (Gaub et Iversen, 1984; Roger et al., 1996; Panis et al., 1997). Chez cette espèce, lorsque la glycémie est contrôlée, l'ablation de 70 à 90% du foie est suivie d'une intense régénération hépatique et n'entraîne pas la mort (Gaub et Iversen, 1984; Roger et al., 1996). Un modèle d'hépatectomie de 95 % de la masse hépatique résultant en un taux de mortalité de 80 % a été développé par Roger et collègues (Roger et

al., 1996). Cependant, peu d'informations sont disponibles sur les changements biochimiques et neurologiques associés à ce modèle. En général, les modèles d'hépatectomie partielle se prêtent mal à l'étude de l'IHA puisqu'ils ne produisent pas d'encéphalopathie et reproduisent mal la condition clinique observée chez l'humain. Ils sont cependant fort utiles pour l'étude de la régénération hépatique.

2.1.3 Dévascularisation hépatique complète

La dévascularisation hépatique complète peut être obtenue par la construction chirurgicale d'une anastomose porto-cave suivie, 24 heures plus tard, par la ligature de l'artère hépatique. Cette approche a été utilisée afin d'obtenir des modèles d'IHA dans plusieurs espèces dont le rat (Olafsson et al., 1995; Rose et al., 2000), le chien (Rozga et al., 1993) et le cochon (Hanid et al., 1979). Chez le rat, la dévascularisation hépatique produit une encéphalopathie progressive résultant, 8 à 10 heures après la dévascularisation, en un état appelé le précoma (caractérisé par la perte du réflexe de redressement), suivi en moyenne 12 à 15 heures après la dévascularisation, du coma hépatique (caractérisé par la perte du réflexe cornéen en plus de la perte du réflexe de redressement) (Rose et al., 2000). De plus, les animaux développent un œdème cérébral et subissent une augmentation de la pression intracrânienne (Olafsson et al., 1995; Rose et al., 2000). L'hypothermie légère retarde l'apparition de l'encéphalopathie et prévient l'œdème cérébral (Traber et al., 1989; Rose et al., 2000). Par conséquent, la température corporelle doit être contrôlée avec soin dans ce modèle. La présence d'œdème cérébral et d'une encéphalopathie dont les stades sont facilement identifiables par un examen sommaire des animaux font de ce modèle un outil adéquat pour l'étude de l'IHA et de ses complications neurologiques. Cependant, ce modèle souffre de deux désavantages principaux. D'abord, le foie étant isolé de la

circulation sanguine, ce modèle fait abstraction des cytokines pro-inflammatoires libérées par le foie nécrotique, alors que ces cytokines contribuent potentiellement aux complications systémiques et neurologiques de l'IHA. D'autre part, il s'agit d'un modèle irréversible, ce qui rend l'évaluation de nouvelles thérapies difficile puisque leur effet sur la survie ne peut être déterminé. Malgré cela, il est possible, dans une certaine mesure, d'évaluer l'effet de certains traitements dans ce modèle, par exemple lorsque ceux-ci retardent l'apparition de l'œdème et de l'encéphalopathie. C'est en effet le cas de l'hypothermie légère (dont nous discuterons en détails à la section 5.7) dont les effets neuroprotecteurs lors de l'IHA ont été étudiés en détail dans le modèle de dévascularisation hépatique chez le rat. L'hypothermie est maintenant utilisée dans certaines unités cliniques afin de prolonger la vie de patients en attente d'une transplantation hépatique.

Malgré ces désavantages, ce modèle reste très avantageux pour l'étude des complications neurologiques de l'IHA chez le rat. Puisque la dévascularisation hépatique est un modèle reproductible et bien caractérisé, cette technique a été utilisée dans cette thèse pour induire l'IHA dans les études menées chez le rat.

2.1.4 Dévascularisation transitoire

Afin de pallier au manque de réversibilité des modèles de dévascularisation hépatique complète, des modèles de dévascularisation transitoire ont été développés chez le cochon (De Groot et al., 1987; Benoist et al., 2000; Fourneau et al., 2000). La dévascularisation transitoire est obtenue par la construction d'une anastomose porto-cave suivie, deux à trois jours plus tard, par l'occlusion temporaire de l'artère hépatique et du canal cholédoque. Cette procédure est associée à une mortalité élevée survenant à la suite

d'une période de coma hépatique et les analyses biochimiques confirment la présence d'IHA. Ces modèles ont l'avantage d'être potentiellement réversibles et de maintenir le foie malade *in situ* et sont par conséquent particulièrement intéressants pour l'étude de l'IHA.

2.2 Modèles hépatotoxiques d'IHA

Plusieurs toxines hépatiques ont été utilisées dans le but d'obtenir des modèles animaux d'IHA, les plus fréquentes étant l'acétaminophène, la galactosamine et la thioacétamide. En général, ces modèles comportent de nombreux problèmes de reproductibilité dus à des variations du métabolisme hépatique d'un animal à l'autre. De plus, les toxines utilisées ont souvent des effets toxiques sur d'autres organes que le foie, ce qui peut introduire des variables indésirables pour un modèle d'IHA.

2.2.1 Acétaminophène

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, le surdosage d'acétaminophène est la cause la plus fréquente d'IHA dans les pays occidentaux. Pour cette raison, plusieurs laboratoires ont tenté de développer des modèles expérimentaux d'IHA causés par l'acétaminophène, avec plus ou moins de succès en raison d'une faible reproductibilité du dommage hépatique causé par l'acétaminophène. L'acétaminophène est normalement métabolisé dans le foie par des mécanismes de glucuronidation et de sulfatation. Cependant, lors d'une surdose, ces voies métaboliques sont saturées et l'acétaminophène est converti par le cytochrome P450 en un métabolite toxique, le N-acétyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI). Celui-ci peut être détoxifié par le glutathion, mais lorsque les niveaux de glutathion sont épuisés, le NAPQI peut réagir avec les groupements sulfhydryls des protéines et causer la nécrose centrilobulaire (Rahman et Hodgson, 2000).

Afin d'améliorer la reproductibilité de ces modèles, l'administration d'acétaminophène est parfois combinée à diverses stratégies visant l'induction du cytochrome P450 (Rahman et al., 2002) et/ou à la déplétion du glutathion (Kelly et al., 1992; Rahman et al., 2002). La méthémoglobinémie et l'œdème pulmonaire sont des problèmes fréquents associés aux modèles d'IHA causée par l'acétaminophène. Ces complications peuvent cependant être contrôlées par un suivi strict des niveaux sanguins d'acétaminophène combiné à l'administration de doses multiples d'acétaminophène (Kelly et al., 1992), ce qui complique beaucoup l'application de ce modèle. De plus, l'acétaminophène peut causer l'anémie et a un effet toxique sur les reins et le cœur (Francavilla et al., 1989; Rahman et Hodgson, 2000).

2.2.2 Galactosamine

La galactosamine est un sucre aminé dont le métabolisme hépatique entraîne une déplétion des groupements uridine, qui affecte le métabolisme des acides ribonucléiques des hépatocytes et cause une nécrose hépatique diffuse. Cette toxine est fréquemment utilisée pour induire l'IHA chez le lapin et le chien (Blitzer et al., 1978; Sielaff et al., 1995; Patzer et al., 2002). Chez le rat, son utilisation est controversée, car l'absence de symptômes d'encéphalopathie a été rapportée par certains groupes (Mullen et al., 1988).

2.2.3 Thioacétamide

L'administration intrapéritonéale ou par gavage de thioacétamide cause la nécrose centrilobulaire et a été utilisée afin d'obtenir des modèles d'IHA chez plusieurs espèces, dont le rat (Zimmerman, 1986) et la souris (Caballero et al., 2001). Ces modèles ne sont cependant pas idéaux pour l'étude des complications cérébrales de l'IHA, car la thioacétamide et ses métabolites sont détectés dans le cerveau suite à leur administration

chez le rat (Peeling et al., 1993) et une perte neuronale s'aggravant avec la progression de l'encéphalopathie a été observée chez ces animaux, ce qui n'est généralement pas une caractéristique propre à l'IHA (Peeling et al., 1993). Il n'est donc pas exclu que la thioacétamide ait un effet neurotoxique indésiré. Les études portant sur le SNC dans ce modèle d'IHA doivent donc être interprétées avec précaution.

2.3 Modèles infectieux d'IHA

L'hépatite virale demeure une cause très importante d'IHA dans certaines régions du monde, dont l'Inde et l'Asie (Cheng et al., 2003). Malheureusement, les efforts visant à développer un modèle viral d'IHA se sont généralement avérés infructueux. Par exemple, dans une étude menée dans les années 1970, il a été rapporté que le virus hépatique A-59 spécifique aux souris cause la nécrose hépatique et la mort de 80% des animaux 48 heures après son administration. Aucun signe d'encéphalopathie n'a cependant été rapporté chez les souris infectées (Farivar et al., 1976). Plus récemment, un modèle infectieux d'IHA causé par le virus de la maladie hémorragique du lapin (VMHL) a été décrit (Tunon et al., 2003). Ce virus cause une importante nécrose hépatique et la mort chez la majorité des animaux infectés. De plus, les animaux développent une encéphalopathie et un œdème cérébral suffisamment importants pour causer l'augmentation de la pression intracrânienne. Ces symptômes ne peuvent être attribués à l'entrée du virus dans le SNC puisque celui-ci n'est pas détecté dans le cerveau suite à l'infection (Prieto et al., 2000). Bien qu'il ait le désavantage majeur de n'être applicable qu'au lapin, le modèle décrit par Tunon et collègues présente un grand intérêt car il s'agit du premier modèle expérimental satisfaisant d'IHA causé par un agent infectieux.

3. Patophysiologie de l'œdème cérébral et de l'encéphalopathie hépatique associés à l'IIHA

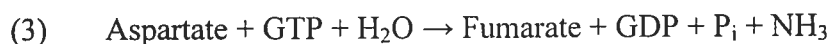
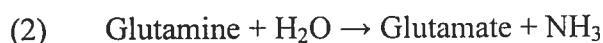
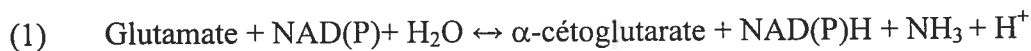
3.1 L'ammoniaque

L'ammoniaque joue un rôle central dans l'apparition de l'encéphalopathie hépatique. Les travaux de Eck, en 1877, furent parmi les premiers à suggérer une association entre le métabolisme de l'azote et l'apparition de symptômes neurologiques tels la perte de coordination, la stupeur et le coma, observés suite à un repas riche en viande chez des chiens ayant subi une anastomose porto-cave (Eck, 1877). L'hyperammoniémie survient dans diverses situations pathologiques telles que les désordres congénitaux du cycle de l'urée, le syndrome de Reye et la dysfonction hépatique. Ces syndromes hyperammoniémiques sont souvent associés à une gamme commune de symptômes neuropsychiatriques comprenant certains déficits cognitifs, les convulsions et le coma. La nature et la sévérité des désordres neurologiques associés à l'hyperammoniémie dépendent entre autres du degré d'hyperammoniémie et de l'âge (Butterworth, 1998).

En solution aqueuse, il s'établit un équilibre entre la forme gazeuse (NH_3) et la forme ionique (NH_4^+) de l'ammoniaque. Sous sa forme gazeuse, l'ammoniac peut diffuser librement à travers les membranes biologiques, alors que la forme ionique de l'ammoniaque possède des propriétés similaires à l'ion potassium (K^+) et doit donc emprunter des canaux ioniques afin de traverser la membranes plasmique. Dans les conditions physiologiques normales de pH et de température, on estime qu'environ 98 % de l'ammoniaque est sous forme ionique (NH_4^+).

3.1.1 Métabolisme de l'ammoniaque

Une grande partie de l'ammoniaque produit normalement chez un individu en santé provient de l'activité bactérienne intestinale et de la digestion des protéines dans l'intestin (Cooper et Plum, 1987; Cooper, 1996). On estime en effet que plusieurs grammes d'ammoniaque par jour atteignent ainsi la circulation porte (Summerskill et Wolpert, 1970; Cooper et Plum, 1987). En plus de l'ammoniaque provenant de l'intestin, de nombreuses réactions métaboliques prenant part dans divers organes (muscle squelettique, rein, cerveau, etc.) contribuent à la production d'ammoniaque. Les plus importantes sont la désamination oxydative du glutamate catalysée par l'enzyme glutamate déshydrogénase (équation 1), la désamination de la glutamine catalysée par la glutaminase (équation 2) et le cycle des purines (équation 3) (Cooper et Plum, 1987).



Malgré la quantité importante d'ammoniaque produit chaque jour chez un individu sain, les niveaux artériels d'ammoniaque demeurent relativement bas, 45 μM environ (Clemmesen et al., 2000), grâce à son élimination efficace par plusieurs organes.

A) Élimination par le foie. Une grande partie de l'ammoniaque en provenance de la circulation portale est détoxifiée par le foie grâce à un processus compartimenté faisant intervenir deux voies métaboliques distinctes mais complémentaires. D'une part, en première ligne, les hépatocytes périportaux assurent 70 % du métabolisme hépatique de

l'ammoniaque grâce à la synthèse de l'urée. Le cycle de l'urée constitue un système à faible affinité pour l'ammoniaque, mais à grande capacité (Haussinger, 1986). D'autre part, l'ammoniaque ayant échappé au métabolisme des hépatocytes périportaux est converti en glutamine par l'action de l'enzyme glutamine synthétase (GS; équation 4) dans les hépatocytes périveineux (Haussinger, 1986).



La GS catalyse une réaction à haute affinité, mais à faible capacité et est exclusivement localisée dans les cellules périveineuses qui ne représentent que 7 % du total des hépatocytes (Gebhardt et Mecke, 1983; Haussinger et al., 1985). Ces deux mécanismes mis ensemble forment un système efficace de détoxification de l'ammoniaque dans le foie.

B) Élimination par le muscle. En période d'intense activité musculaire, les muscles squelettiques peuvent produire de l'ammoniaque. D'autre part, bien que le muscle ne possède pas de cycle de l'urée fonctionnel, il peut, jusqu'à un certain point éliminer l'ammoniaque grâce à l'action de la GS. Bien que l'activité musculaire de la GS soit relativement faible, le muscle représente tout de même un site important pour le métabolisme de l'ammoniaque en vertu de sa masse importante dans l'organisme (Lockwood et al., 1979). L'importance relative du muscle dans le métabolisme de l'ammoniaque augmente significativement lors de la dysfonction hépatique, alors que le métabolisme hépatique de l'ammoniaque est compromis (Olde Damink et al., 2002).

C) Élimination par le cerveau. Chez des volontaires sains, on observe une différence artério-veineuse positive entre les concentrations d'ammoniaque, indiquant une certaine capacité du cerveau à métaboliser l'ammoniaque (Warter et al., 1983). Cependant, tout comme le muscle, le cerveau est dépourvu d'un cycle de l'urée complet.

L'ammoniaque cérébral est donc presque exclusivement converti en glutamine grâce à l'action de la GS. Ainsi, suite à l'administration d'un bolus d'ammoniaque marqué ($[^{13}\text{N}]$ ammoniaque) dans l'artère carotide chez le rat, celui-ci est presque exclusivement incorporé à la glutamine par une réaction très rapide de la GS ($t_{1/2} \leq 3\text{s}$) (Cooper et al., 1979). La GS étant presque uniquement exprimée par les astrocytes (Norenberg et Martinez-Hernandez, 1979), on peut conclure que ceux-ci sont en grande partie responsables du métabolisme cérébral de l'ammoniaque. Cependant, la capacité du cerveau à métaboliser l'ammoniaque est plutôt limitée car on estime que dans les conditions physiologiques normales, la GS fonctionne presque à capacité maximale (Cooper et Plum, 1987). Ainsi, lors de l'hyperammoniémie, contrairement à ce qu'on observe dans le muscle, l'activité et l'expression de la GS ne sont pas augmentées, ce qui cause une élévation importante des niveaux cérébraux d'ammoniaque (Desjardins et al., 1999b; Felipo et Butterworth, 2002).

3.1.2 L'ammoniaque dans l'IHA

Chez les patients atteints d'IHA les niveaux plasmatiques d'ammoniaque s'élèvent rapidement et peuvent atteindre entre 0,3 et 0,5 mM (Clemmesen et al., 1999) en raison de la capacité réduite du foie à détoxifier cette toxine. Dans les modèles animaux d'IHA, les niveaux plasmatiques d'ammoniaque sont également très élevés, entre 0,5 et 1 mM (Mans et al., 1994; Rose et al., 2000). Lors de l'IHA, les niveaux d'ammoniaque cérébraux peuvent être jusqu'à 8 fois plus élevés que les niveaux plasmatique, alors que le ratio normal ($[\text{NH}_3_{\text{cerveau}}] / [\text{NH}_3_{\text{plasma}}]$) se situe entre 1 et 2 (Cooper et Plum, 1987). Ainsi, la concentration cérébrale d'ammoniaque peut atteindre entre 1 et 5 mM dans les divers modèles animaux (Felipo et Butterworth, 2002). Une étude récente démontre une

augmentation de la capture de l'ammoniaque sanguin par le cerveau chez des patients atteints d'IHA (Jalan et al., 1999), un mécanisme vraisemblablement impliqué dans l'écart important entre les niveaux plasmatiques et cérébraux d'ammoniaque lors de l'IHA.

De nombreuses études démontrent que l'hyperammoniémie survenant lors de l'IHA est à l'origine d'un gonflement pathologique des astrocytes causant l'œdème cérébral. En effet, mis à part l'IHA, l'œdème cérébral peut survenir dans divers désordres caractérisés par des niveaux plasmatiques élevés d'ammoniaque parmi lesquels on compte le syndrome de Reye et les désordres congénitaux du cycle de l'urée. Le rôle de l'ammoniaque lors de l'IHA est illustré par le fait que la probabilité de développer une herniation du tronc cérébral, une conséquence fatale de l'œdème cérébral non contrôlé, est plus importante chez les patients dont les niveaux artériels d'ammoniaque sont élevés ($\geq 150 \mu\text{M}$) (Clemmesen et al., 1999). D'autre part, l'administration d'ammoniaque chez de jeunes primates cause un gonflement astrocytaire suffisamment important pour induire une augmentation de la pression intracrânienne (Voorhies et al., 1983) et l'infusion d'ammoniaque chez le chien (Fujiwara et al., 1985) et le rat (Takahashi et al., 1991) résulte également en un œdème cérébral. Chez le rat ayant subi une anastomose porto-cave, l'administration d'ammoniaque précipite l'apparition de l'œdème cérébral et l'augmentation de la pression intracrânienne (Blei et al., 1994). Enfin, l'exposition de cultures primaires d'astrocytes à des niveaux patophysiologiques d'ammoniaque cause également un gonflement de ces cellules (Norenberg et al., 1991). Selon une hypothèse répandue, l'œdème cérébral causé par l'ammoniaque est dû à l'accumulation de glutamine produite lors de la détoxification de l'ammoniaque par la GS. En effet, la glutamine étant un osmolyte organique, son accumulation dans les astrocytes serait à l'origine du

gonflement astrocytaire caractéristique observé lors de l'IHA (Brusilow, 1986; Blei, 2001). Cette hypothèse est appuyée par le fait que la concentration cérébrale de glutamine est augmentée tant chez l'humain que dans les modèles animaux d'IHA (Butterworth, 2003). Comme nous le verrons plus loin, bien que l'effet osmotique de la glutamine soit fort possiblement en cause, il est de plus en plus évident que d'autres mécanismes contribuent également au développement de l'œdème cérébral lors de l'IHA.

En plus de contribuer à l'œdème cérébral, l'ammoniaque est impliqué dans plusieurs mécanismes pathophysiologiques associés à l'IHA. Entre autres, l'ion ammonium (NH_4^+) affecte le potentiel membranaire des cellules nerveuses et cause des anomalies de la neurotransmission excitatrice et inhibitrice qui pourraient contribuer directement à l'apparition de certains symptômes de l'EH tels la léthargie et le coma (Cooper et Plum, 1987). Comme nous le verrons en détail plus loin, il semble également que l'ammoniaque affecte le métabolisme énergétique en plus d'être impliqué dans diverses modifications de l'expression génique du SNC lors de l'IHA (voir section 4).

3.2 Autres toxines en provenance de la périphérie

3.2.1 Oxindole

L'oxindole est un métabolite du tryptophane présent entre autres dans le sang et le cerveau chez plusieurs espèces, dont l'humain (Mannaioni et al., 1999). L'administration d'oxindole chez des rats normaux provoque des symptômes neurologiques similaires à ceux observés chez des patients atteints d'IHA, c'est-à-dire une diminution de l'activité locomotrice, le coma et la mort (Mannaioni et al., 1999). L'oxindole est synthétisé à partir de l'indole, lui-même formé dans l'intestin par l'activité bactérienne. Lors d'une dysfonction hépatique, l'indole atteint la circulation systémique et subit une oxydation qui

se traduit par la formation d'oxindole. Une étude menée par Carpenedo et collègues (1998) démontre une augmentation significative des niveaux plasmatiques et cérébraux d'oxindole dans deux modèles différents d'IHA chez le rat (modèles hépatotoxiques causés par la thioacétamide et la galactosamine). Bien que les niveaux d'oxindole observés dans cette étude ne sont pas suffisants pour expliquer à eux seuls l'apparition du coma chez ces animaux, il est possible que l'oxindole contribue aux symptômes de l'EH. En effet, une étude démontre que les niveaux circulants d'indole augmentent proportionnellement avec le grade d'encéphalopathie chez des patients ayant une dysfonction hépatique (Suyama et Hirayama, 1988).

3.2.2 Benzodiazépines

Le début des années 1980 a vu émerger une théorie selon laquelle une augmentation de la neurotransmission GABAergique pourrait être en partie responsable de l'altération de l'état de conscience ainsi que des troubles du mouvement caractéristiques de l'encéphalopathie hépatique (EH). De nombreuses études ont par la suite démontré que les niveaux de GABA ainsi que l'expression des récepteurs GABAergique est inchangée lors de l'IHA. En contrepartie, une augmentation des niveaux de benzodiazépines endogènes, qui ont un puissant effet potentialisant sur l'activité du récepteur GABA_A, contribue possiblement à augmenter la neurotransmission GABAergique lors de l'IHA. Des concentrations accrues de benzodiazépines sont en effet présentes dans le cerveau (Basile et al., 1991) et le plasma (Basile et al., 1994) de patients atteints d'IHA et leur niveau est directement proportionnel avec la sévérité de l'encéphalopathie de ces patients (Basile et al., 1994). Des niveaux élevés d'agonistes du récepteur des benzodiazépines sont également observés dans le cerveau de rats ayant une IHA causée par l'administration de

thioacétamide et sont également en relation avec la sévérité de l'encéphalopathie (Basile et al., 1990; Olasmaa et al., 1990; Yurdaydin et al., 1993). La source de ces benzodiazépines demeure incertaine, mais une étude suggère que la flore intestinale serait la source d'un précurseur inactif des benzodiazépines (Yurdaydin et al., 1995). Bien que le rôle précis de ces benzodiazépines ainsi que leur identité demeurent peu connus, une potentialisation du tonus GABAergique induite par ceux-ci et contribuant à l'EH demeure une hypothèse plausible.

3.3 L'œdème cérébral

L'œdème cérébral survient chez 70 à 80 % des patients ayant une encéphalopathie hépatique aiguë au stade 4 et constitue l'une des principales causes de décès (50 % environ) suite à l'IHA (Gill et Sterling, 2001; Richardson et Bellamy, 2002). D'un point de vue théorique, le volume cérébral total peut être divisé en trois compartiments distincts : les tissus cérébraux (eux-mêmes constitués d'un compartiment extracellulaire et d'un compartiment intracellulaire), le liquide céphalo-rachidien et le volume sanguin. Ainsi, l'expansion de n'importe quel de ces compartiments entraîne une augmentation de la pression intracrânienne en raison de la nature rigide du crâne qui ne permet qu'une augmentation minime du volume cérébral. On distingue deux types d'œdème cérébral : l'œdème vasogénique et l'œdème cytotoxique. Le premier est généralement associé à une augmentation de la perméabilité de la BHE entraînant une expansion du liquide interstitiel, alors que le second est le résultat de dérangements de l'osmolarité intracellulaire causant un gonflement des cellules. Des études de microscopie électronique démontrent que l'œdème cérébral observé lors de l'IHA tant chez l'humain (Kato et al., 1992) que chez les modèles animaux d'IHA (Hanid et al., 1979; Traber et al., 1987; Dixit et Chang, 1990) est de nature

cytotoxique et est localisé au niveau des astrocytes, alors que les neurones gardent un aspect normal. Chez les patients atteints d'IHA, une attention particulière est portée au contrôle de la pression intracrânienne, bien sûr dans le but d'éviter l'herniation cérébrale causant la mort, mais également afin d'éviter une diminution de la pression de perfusion cérébrale (PPC). En effet, la PPC est définie comme la différence entre la pression artérielle moyenne et la pression intracrânienne (équation 5). Par conséquent, une augmentation de la pression intracrânienne se traduit par une diminution de la PPC qui, si elle est suffisamment sévère ($< 50 - 60$ mmHg) entraîne l'hypoxie cérébrale.

$$(5) \quad \text{pression de perfusion cérébrale} = \text{pression artérielle moyenne} - \text{pression intracrânienne}$$

3.3.1 Effet osmotique de la glutamine

Comme nous l'avons vu en détail à la section 3.1.2, de nombreuses études démontrent qu'il existe un lien entre l'hyperammoniémie et l'œdème cérébral. Brusilow (1986) fut le premier à émettre l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de glutamine résultant de la détoxification de l'ammoniaque par la GS dans les astrocytes, plutôt que l'ammoniaque lui-même, a un effet osmotique favorisant l'accumulation d'eau dans le cerveau. Ce phénomène pourrait ainsi expliquer la localisation principalement astrocytaire de l'œdème cytotoxique cérébral observé lors de l'IHA. En faveur de cette hypothèse, l'inhibition de la synthèse de glutamine suite à l'administration d'un inhibiteur irréversible de la GS, la méthionine sulfoximine (MSO), prévient l'œdème cérébral chez le rat hyperammonémique (Takahashi et al., 1990), atténue l'œdème cérébral et prévient l'augmentation de la pression intracrânienne chez le rat ayant une anastomose porto-cave (Blei et al., 1994) et ce, malgré une augmentation des niveaux d'ammoniaque secondaire à l'inhibition de la GS. Dans un système *in vitro*, la MSO inhibe complètement le gonflement

des astrocytes primaires en culture causé par une exposition à l'ammoniaque (Norenberg et Bender, 1994).

Bien que l'effet osmotique de la glutamine soit fort probablement un facteur contribuant à l'œdème cérébral causé par l'hyperammoniémie, cette hypothèse comporte quelques failles suggérant que d'autres mécanismes sont également en cause. En effet, chez le rat avec une anastomose porto-cave recevant une infusion d'ammoniaque, le MSO n'inhibe que de façon incomplète l'œdème cérébral (Blei et al., 1994). De plus, l'augmentation de la dose de MSO ne prévient pas davantage l'œdème cérébral malgré une baisse plus importante de la concentration corticale de glutamine (Blei et al., 1994). D'autre part, on observe un effet protecteur de l'hypothermie légère sur le développement de l'œdème cérébral dans le modèle de dévascularisation hépatique chez le rat (Chatauret et al., 2003) ainsi que chez le rat avec une anastomose porto-cave recevant une infusion d'ammoniaque (Cordoba et al., 1999) alors que dans les deux cas, les niveaux cérébraux de glutamine, eux, restent aussi élevés que chez les animaux normothermiques développant un œdème cérébral. Il est intéressant de noter que chez le rat ayant une IHA, d'autres osmolytes que la glutamine, tels le lactate ou l'alanine, sont en corrélation plus étroite avec l'apparition de l'œdème cérébral (Chatauret et al., 2003). Au cours des dernières années, une attention grandissante a été portée au rôle possible d'anomalies hémodynamiques comme facteur contribuant à l'œdème cérébral lors de l'IHA.

3.3.2 Dérangements hémodynamiques

Deux principales observations cliniques démontrent la présence de dérangements hémodynamiques cérébraux importants chez les patients atteints d'IHA. En premier lieu, on observe des changements marqués du flot sanguin cérébral. En effet, alors que certaines

études démontrent une forte variabilité du flot sanguin cérébral d'un patient à l'autre (Wendon et al., 1994; Aggarwal et al., 1994), d'autres études démontrent une augmentation du flot sanguin cérébral chez la plupart des patients à un stade avancé de l'IHA (Jalan et al., 1999; Jalan et al., 2001). Fait intéressant, les patients qui développent un œdème cérébral présentent des valeurs de flot sanguin cérébral plus élevées comparativement aux patients ne présentant pas d'œdème cérébral (Wendon et al., 1994; Aggarwal et al., 1994). De plus, dans un modèle d'œdème cérébral chez le rat, le contenu en eau du cerveau et la pression intracrânienne augmentent de façon directement proportionnelle au flot sanguin cérébral (Larsen et al., 2001).

En deuxième lieu, lors de l'IHA, on observe une perte de l'autorégulation du flot sanguin cérébral, c'est-à-dire la capacité du cerveau à garder un débit sanguin constant malgré les fluctuations de la pression sanguine systémique. En effet, dans une situation normale, la pression artérielle n'affecte pas le flot sanguin cérébral qui est plutôt lié de près au métabolisme cérébral. Par contre, chez les patients atteints d'IHA, une augmentation de la pression artérielle suite à l'administration de noradrénaline se traduit par une augmentation concomitante du flot sanguin cérébral (Larsen et al., 1995; Strauss et al., 1997). La capacité de la vasculature cérébrale à réagir aux changements de la pression partielle du CO_2 (pCO_2) est un mécanisme d'importance centrale pour un couplage normal de l'activité métabolique cérébrale avec le flot sanguin cérébral. Or, chez les patients atteints d'IHA, on observe une perte de réactivité de la vasculature cérébrale au CO_2 lors de situations d'hypercapnie (Durham et al., 1995; Larsen et al., 1996). Dans leur ensemble, ces études suggèrent la présence d'un état permanent de vasodilatation cérébrale chez les patients atteints d'IHA, contribuant aux dérangements du flot sanguin cérébral.

Trois principaux mécanismes peuvent expliquer la contribution d'une augmentation du flot sanguin cérébral au développement de l'œdème cérébral associé à l'IHA (Vaquero et al., 2004b). Premièrement, une augmentation du flot sanguin cérébral augmente le gradient de pression hydrostatique à travers les capillaires sanguins, favorisant le mouvement d'eau à travers la BHE. Deuxièmement, une augmentation du volume sanguin contribue directement à l'élévation de la pression intracrânienne. Finalement, une élévation du flot sanguin cérébral augmente l'exposition du cerveau aux toxines circulantes pouvant contribuer à l'œdème cérébral (la plus importante étant l'ammoniaque). À l'appui du rôle de tels mécanismes, il est intéressant de noter que l'œdème cérébral peut être réduit ou prévenu grâce à diverses approches visant à diminuer le flot sanguin cérébral telles l'hyperventilation (Ede et al., 1986), l'hypothermie (Cordoba et al., 1999; Rose et al., 2000; Jalan et al., 2001) ou l'administration du vasoconstricteur cérébral indométhacine (Clemmesen et al., 1997; Chung et al., 2001).

Les mécanismes précis responsables de l'augmentation du flot sanguin cérébral lors de l'IHA sont inconnus. Plusieurs hypothèses ont été émises parmi lesquelles la relâche accrue par le cerveau de facteurs pouvant induire la vasodilatation, par exemple l'oxyde nitrique (NO), le lactate ou le glutamate (Vaquero et al., 2004b). D'autre part, il est également possible que certains facteurs en provenance de la périphérie, par exemple les cytokines pro-inflammatoires relâchées par le foie nécrotique, soient à l'origine de l'augmentation du flot sanguin cérébral lors de l'IHA (Vaquero et al., 2004b).

3.4 Altérations du métabolisme énergétique lors de l'IHA

3.4.1 Métabolisme énergétique cérébral

La demande énergétique cérébrale est considérablement élevée en comparaison à celle d'autres organes, en grande partie en raison de la quantité importante d'énergie nécessaire à la génération de potentiels d'action et au maintien des gradients électrochimiques à travers la membrane plasmique des neurones (Attwell et Laughlin, 2001). Malgré son métabolisme énergétique élevé, le cerveau ne contient que très peu de réserves énergétiques (surtout stockées sous forme de glycogène (Gruetter, 2003)) et dépend donc presque exclusivement de l'apport de glucose provenant de la circulation sanguine pour le maintien de son équilibre énergétique grâce à la glycolyse suivie de l'oxydation complète du pyruvate par le cycle de Krebs. Le transport du glucose à travers les membranes biologiques est effectué par une famille de transporteurs facilitateurs du glucose indépendants du sodium dont plusieurs isoformes sont exprimés dans le SNC. Dans le cerveau, les deux principaux transporteurs du glucose responsables de fournir le glucose nécessaire au métabolisme énergétique sont GLUT1, qui est présent sous deux formes différant par leur degré de glycosylation et est exprimé par les astrocytes et les cellules endothéliales de la BHE, et GLUT3, exprimé par les neurones (Vannucci et al., 1997; Duelli et al., 2001). D'autres isoformes de la famille des transporteurs du glucose sont également exprimés à de plus faibles niveaux par certaines populations cellulaires précises (Tableau 1.2), suggérant un rôle très spécialisé de ces transporteurs.

Isoforme	Localisation
GLUT1 (55 kDa)	Cellules endothéliales de la BHE
GLUT1 (45 kDa)	Astrocytes
GLUT2	Astrocytes: hypothalamus latéral, noyau hypothalamique paraventriculaire, hypothalamus ventromédian, noyau arqué
GLUT3	Neurones
GLUT4	Neurones (populations spécifiques du cervelet, de l'hypothalamus et de l'hippocampe)
GLUT5	Microglie
GLUT8	Neurones (transporteur intracellulaire exprimé au niveau du réticulum endoplasmique)

Tableau 1.2 Isoformes de la famille des transporteurs du glucose exprimés dans le SNC

3.4.2 Dérangements du métabolisme énergétique lors de l'IHA

3.4.2.1 Observations expérimentales et cliniques

Jusqu'à présent, les différentes études s'étant intéressées au métabolisme du glucose chez les patients atteints d'une IHA ont fait état de résultats contradictoires, en démontrant un flux métabolique du glucose (« cerebral metabolic rate ») soit à la hausse (Jalan et al., 1999), normal (Wendon et al., 1994) ou à la baisse (Wendon et al., 1994; Strauss et al., 2003). Par contre, on rapporte un flux métabolique de l'oxygène à la baisse dans toutes les études menées chez ces patients (Wendon et al., 1994; Aggarwal et al., 1994; Strauss et al., 2003), suggérant la présence de dérangements du métabolisme oxydatif lors de l'IHA.

Malgré ces changements, il ne semble pas y avoir de déficit énergétique cérébral net lors de l'IHA. En effet, des études de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du ^{31}P menées dans deux modèles animaux différents d'IHA ne démontrent aucun changement des concentrations cérébrales d'ATP et de phosphocréatine lors de l'IHA (Deutz et al., 1988a; Bates et al., 1989). En contrepartie, il est maintenant devenu évident que certaines anomalies plus subtiles du métabolisme énergétique cérébral surviennent lors de l'IHA,

comme en témoignent de nombreuses études rapportant une accumulation cérébrale de lactate lors de l'IHA (Mans et al., 1994; Nyberg et al., 1998; Tofteng et al., 2002; Zwingmann et al., 2003).

3.4.2.2 Rôle de l'ammoniaque

Les causes exactes de ces dérangements du métabolisme énergétique cérébral ne sont pas connues. Cependant, de nombreuses études menées dans des modèles d'hyperammoniémie pure *in vivo* ou *in vitro* démontrent que l'ammoniaque affecte le métabolisme énergétique cellulaire. À des concentrations similaires à celles observées dans le cerveau lors de l'IHA, l'ammoniaque a un effet inhibiteur sur l' α -cétoglutarate déshydrogénase (α KGDH) (Lai et Cooper, 1986) ainsi que sur l'isocitrate déshydrogénase (Katunuma et al., 1966), deux enzymes du cycle de Krebs. Chez des rats recevant une dose aiguë d'ammoniaque, on observe une augmentation de l'activité de la plupart des enzymes de la glycolyse dans plusieurs régions du cerveau (Ratnakumari et Murthy, 1993), possiblement en réponse à l'inhibition de cycle de Krebs causée par l'ammoniaque.

En plus de modifier l'activité de diverses enzymes directement impliquées dans le métabolisme énergétique, il semble que l'ammoniaque affecte la navette malate-aspartate, le principal mécanisme permettant le transfert d'équivalents réducteurs (NADH) du cytosol vers la mitochondrie où s'effectue la phosphorylation oxydative. Il a en effet été démontré que l'hyperammoniémie cause une diminution du ratio $[NAD^+]/[NADH]$ cytoplasmique alors que le ratio $[NAD^+]/[NADH]$ mitochondrial augmente (Hindfelt et Siesjo, 1971). Des études subséquentes démontrent que l'administration d'ammoniaque chez le rat cause une diminution de l'activité de l'aspartate aminotransférase et de la malate déshydrogénase,

deux enzymes nécessaires au fonctionnement de la navette malate-aspartate (Ratnakumari et Murthy, 1989; Faff-Michalak et Albrecht, 1991).

3.5 Altérations de la barrière hémato-encéphalique lors de l'IHA

La BHE est une spécialisation des cellules endothéliales des capillaires cérébraux qui a pour fonction d'empêcher la diffusion de la plupart des substances contenues dans le sang afin d'assurer le maintien de l'homéostasie tissulaire cérébrale, essentielle au fonctionnement normal du SNC. La fonction normale de la BHE dépend d'une association complexe entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, les astrocytes et les péricytes (Copin et Gasche, 2003). Cependant, ce sont les cellules endothéliales cérébrales qui constituent la BHE grâce à l'acquisition de propriétés morphologiques et biochimiques spécifiques comprenant la perte des fenestrations, la formation de jonctions étanches, la diminution du nombre de vésicules de pinocytose et l'expression de divers transporteurs spécifiques (Ballabh et al., 2004). Ainsi, seules les substances dotées d'un système de transport à la BHE et les molécules liposolubles atteignent le parenchyme cérébral.

Des études de microscopie électronique démontrent que les jonctions étanches des cellules endothéliales cérébrales restent intactes dans différents modèles d'IHA (Traber et al., 1987; Kato et al., 1989) de même que chez des patients atteints d'IHA (Kato et al., 1992). Cependant, chez des patients atteints d'IHA, contrairement à ce qui est observé dans divers modèles expérimentaux, il y a apparition d'un gonflement des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (en plus de l'œdème cytotoxique des astrocytes périvasculaires) (Kato et al., 1992). Il est intéressant de noter que l'efficacité du mannitol pour le contrôle de l'œdème cérébral suggère le maintien de l'intégrité physique de la BHE lors de l'IHA,

puisque le mécanisme d'action de cette substance repose sur la création d'une différence osmotique entre le cerveau et la circulation sanguine nécessitant une BHE intacte.

Bien qu'il semble que l'intégrité générale de la BHE soit maintenue lors de l'IHA, certaines études suggèrent l'apparition de changements subtils de la perméabilité de la BHE dus à une augmentation du transport vésiculaire non spécifique à travers les cellules endothéliales constituant la BHE (Traber et al., 1989; Kato et al., 1989; Kato et al., 1992). Il est possible que de telles modifications de la fonction de la BHE soient en cause dans les mécanismes pathophysiologiques responsables de l'œdème cérébral et de l'EH associés à l'IHA (Duchini, 1996).

3.6 Modifications des concentrations plasmatiques d'acides aminés lors de l'IHA

Le foie étant un organe important pour le métabolisme des acides aminés, l'IHA cause une anomalie typique de la concentration plasmatique des différents acides aminés. On observe en effet une diminution des acides aminés à chaîne ramifiée (leucine, isoleucine et valine) alors que la plupart des autres acides aminés sont à la hausse. Une caractéristique typique de l'IHA est la baisse du ratio de Fisher, défini comme [acides aminés à chaîne ramifiée] / [acides aminés aromatiques] (Fischer et al., 1976). Un déséquilibre de la quantité relative des acides aminés dans le plasma peut avoir des conséquences au niveau du SNC puisque les acides aminés, dont certains sont des précurseurs pour la synthèse de neurotransmetteurs, compétitionnent pour un nombre limité de transporteurs à la BHE. Ainsi, l'augmentation relative des acides aminés aromatiques tels la tyrosine, l'histidine et le tryptophane, eux-mêmes précurseurs des catécholamines, de l'histamine et de la sérotonine, respectivement, peut induire un débalancement de plusieurs systèmes de neurotransmission.

4. Modifications de l'expression génique du système nerveux central associées à l'insuffisance hépatique aiguë

Suite à la dysfonction aiguë du foie, plusieurs changements rapides de l'expression génique surviennent dans le SNC. Cela peut être illustré grâce à la technique de « differential display - RT-PCR » qui permet d'obtenir un aperçu d'ensemble de l'expression génique à un moment donné (Figure 1.3). On observe ainsi des changements d'expression de plusieurs gènes chez les rats avec une IHA par rapport aux animaux contrôles, la plupart démontrant une expression à la hausse, mais parfois également à la baisse.

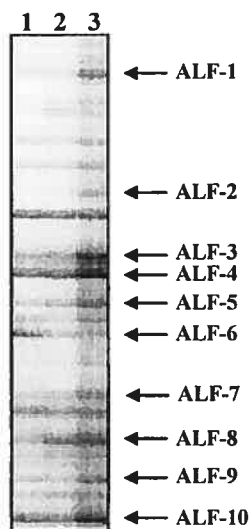


Figure 1.3 Altérations de l'expression des ARNm dans le cortex frontal de rats ayant une IHA causée par la dévascularisation hépatique. L'ARN provenant de cerveaux de rats sacrifiés 6 heures après la ligature de l'artère hépatique (ligne 2), au stade de coma (ligne 3) ou de rats contrôles (ligne 1) a été extrait, amplifié par RT-PCR, et séparé par électrophorèse. Dix bandes dont l'expression diffère significativement par rapport aux animaux contrôles sont identifiées. Adapté de (Desjardins et al., 2001).

D'autre part, il semble que certaines de ces modifications surviennent très tôt (6 heures) dans la progression de la maladie, c'est-à-dire avant l'apparition de symptômes de l'encéphalopathie, alors que d'autres ne surviennent que plus tard, au stade de coma (Figure 1.3). Il est cependant important de noter que cette technique ne permet pas l'identification des gènes affectés, qui doit être effectuée par des techniques complémentaires.

Il importe donc par la suite d'identifier ces gènes afin de comprendre les conséquences physiologiques des changements d'expression survenant lors de l'IHA.

Quelques-uns de ces gènes ont été identifiés jusqu'à présent et beaucoup d'entre eux sont impliqués dans des fonctions importantes du SNC, tels la neurotransmission et le maintien du volume cellulaire. Les prochaines sections font état de nos connaissances actuelles quant aux changements d'expression du SNC associés à l'IHA.

4.1 EAAT-2

L'IHA causée par la dévascularisation hépatique chez le rat entraîne une diminution de 31% de l'expression de l'ARNm codant pour le transporteur astrocytaire du glutamate EAAT-2, accompagnée d'une baisse de 60% de son expression protéique (Knecht et al., 1997). EAAT-2 est un transporteur du glutamate à haute affinité fortement exprimé dans le cerveau (Danbolt, 2001). Cette baisse de l'expression de EAAT-2 est possiblement responsable de l'augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate observée dans ce modèle expérimental (Michalak et al., 1996), ayant plusieurs conséquences pathophysiologiques importantes. En effet, il est possible que l'élévation de la concentration extracellulaire de glutamate soit à l'origine des convulsions parfois observées lors de l'IHA. D'autre part, une diminution de la recapture de glutamate par les astrocytes peut ralentir la détoxification de l'ammoniaque en privant la GS d'un de ses substrats (Knecht et al., 1997). Enfin, il est probable que des niveaux extracellulaires élevés de glutamate contribuent à l'œdème cérébral cytotoxique, puisque l'exposition de cultures d'astrocytes au glutamate cause un gonflement cellulaire (Schneider et al., 1992).

4.2 Récepteurs du glutamate

Des études évaluant le nombre de sites de liaison des récepteurs ionotropiques du glutamate révèlent d'autres anomalies du système de neurotransmission glutamatergique

lors de l'IHA. On observe en effet une baisse significative du nombre de sites de liaison spécifiques aux récepteurs glutamatergiques AMPA et kainate dans le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cervelet de rats ayant une IHA, alors que le nombre de sites de liaison du récepteur NMDA est inchangé dans le cerveau de ces animaux (Michalak et Butterworth, 1997).

4.3 *Glyt1*

La glycine est un acide aminé ayant une fonction de neurotransmetteur inhibiteur dans certaines régions du SNC, en particulier le tronc cérébral et la moelle épinière (Probst et al., 1986). Par ailleurs, la glycine agit également comme modulateur allostérique positif des récepteurs glutamatergiques NMDA dans l'ensemble du SNC (Kemp et Leeson, 1993). La concentration extracellulaire de glycine est contrôlée par deux transporteurs à haute affinité pour la glycine (Glyt1 et Glyt2). Glyt1 est exprimé, d'une part, par les astrocytes entourant les synapses glycinergiques (Adams et al., 1995) et, d'autre part, en association avec les régions de forte expression du récepteur NMDA (Smith et al., 1992). Glyt2 est exprimé par les neurones glycinergiques, principalement dans le tronc cérébral et la moelle épinière (Zafra et al., 1995).

Chez le rat avec une IHA induite par la dévascularisation hépatique, on observe une diminution d'environ 50 % de l'ARNm codant pour le transporteur astrocytaire de la glycine Glyt1 dans le cortex frontal au stade de coma (Zwingmann et al., 2002). Il en résulte une importante augmentation des niveaux extracellulaires de glycine dans cette même région cérébrale qui atteignent des niveaux trois fois plus élevés que ceux mesurés chez les animaux contrôles (Zwingmann et al., 2002). Le cortex frontal étant dépourvu de neurones glycinergiques, il semble que cette augmentation des niveaux extracellulaires de

glycine ait pour effet principal d'exacerber, *via* son action sur les récepteurs NMDA, l'hyperactivité de la neurotransmission glutamatergique déjà accrue par des niveaux extracellulaires élevés de glutamate (Michalak et al., 1996).

4.4 Transporteur/récepteur de la sérotonine

Des études de liaison effectuées à l'aide du [³H]citalopram démontrent que l'IHA chez le rat cause une diminution du nombre de sites de liaison du transporteur de la sérotonine dans plusieurs régions cérébrales dont le cortex frontal (Michalak et al., 2001a). Cette baisse du nombre de transporteurs est accompagnée d'une augmentation concomitante de la concentration extracellulaire de sérotonine dans le cortex frontal de ces animaux (Michalak et al., 2001a). Une baisse du nombre de sites de liaison du récepteur de la sérotonine 5-HT_{2A} a également été démontrée chez le rat lors de l'IHA (Kaneko et al., 1998). Il s'agit possiblement d'un mécanisme compensatoire visant à contrecarrer une augmentation de la neurotransmission sérotoninergique; une hypothèse appuyée par une étude démontrant une amélioration de l'état neurologique de rats ayant une IHA suite à l'administration de methysergide, un antagoniste non sélectif des récepteurs de la sérotonine (Yurdaydin et al., 1996).

4.5 Transporteur/récepteurs de la noradrénaline

Une diminution du nombre de sites de liaison du transporteur de la noradrénaline est également observée dans le cortex frontal et le thalamus chez le rat ayant une IHA au stade de coma (Michalak et al., 2001b). Ces rats présentent également une augmentation de la concentration extracellulaire corticale de noradrénaline (Michalak et al., 2001b) et une diminution concomitante du nombre de sites de liaison des récepteurs $\alpha 1$ et $\beta 1$

adrénergiques au niveau du cortex frontal et du thalamus, suggérant un déséquilibre de la neurotransmission noradrénergiques dans ces régions lors de l'IHA (Michalak et al., 1998).

4.6 Récepteur des benzodiazépines de type périphérique (PTBR)

Contrairement au récepteur central des benzodiazépines qui est exprimé exclusivement dans le SNC et est impliqué dans la modulation allostérique du récepteur GABA_A, le récepteur des benzodiazépines de type périphérique (PTBR) est exprimé dans de nombreux organes, dont le rein, le cœur, les testicules, les poumons et le cerveau et n'est pas couplé au récepteur GABAergique (Gavish et al., 1992). Dans le SNC, PTBR est principalement exprimé sur la membrane mitochondriale des cellules gliales (Casellas et al., 2002). Le récepteur des benzodiazépines de type périphérique est un complexe multimérique composé de trois principales sous-unités : une sous-unité de 18 kDa nommée « isoquinoline carboximide binding protein » (IBP), une sous-unité de 34 kDa nommée « voltage-dependent anion channel » (VDAC) et une sous-unité de 30 kDa nommée « adenine nucleotide channel » (ANC) (Figure 1.4).

De nombreuses fonctions cellulaires sont attribuées à PTBR dont un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire (Alho et al., 1994), la biosynthèse de l'hème (Taketani et al., 1995), la modulation du système immunitaire (Woods et Williams, 1996) ainsi que la régulation du pore de transition de perméabilité mitochondriale et l'apoptose (Casellas et al., 2002; Castedo et al., 2002). Cependant, la fonction la mieux étudiée de PTBR dans le cerveau est sans aucun doute son rôle dans la stéroïdogénèse (Papadopoulos et al., 1998). PTBR est en effet impliqué dans le transport du cholestérol vers la matrice mitochondriale où il sert de substrat à l'enzyme cytochrome P450, pour la synthèse de pregnénolone, le précurseur de tous les neurostéroïdes (Mellon et Griffin, 2002). À leur

tour, les neurostéroïdes exercent un effet modulateur sur de nombreux aspects de la fonction cérébrale, dont la transmission GABAergique, la myélinisation, la mémoire et le comportement (Mellon et Griffin, 2002).

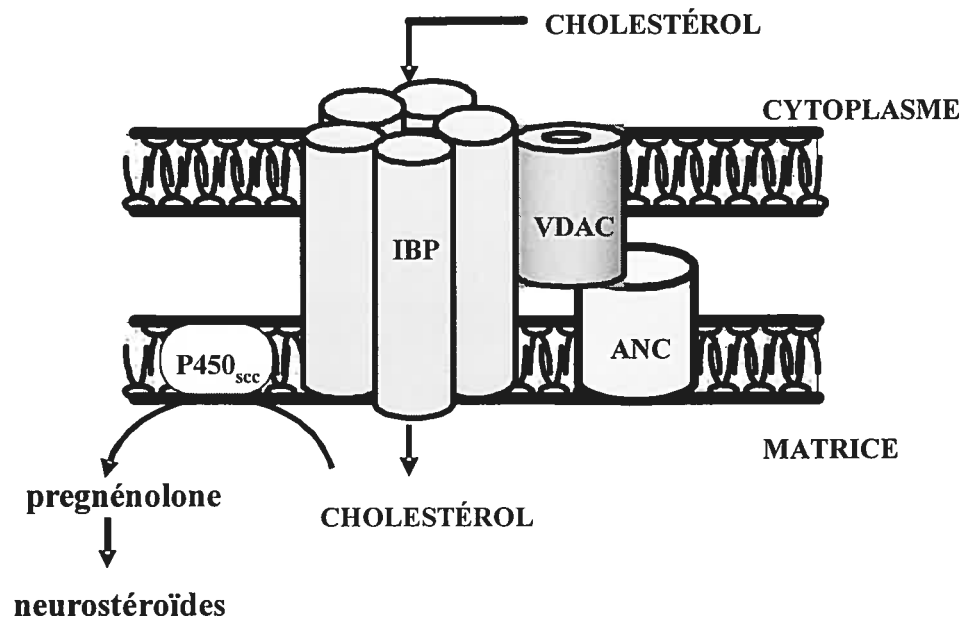


Figure 1.4 Représentation schématique de la structure du récepteur aux benzodiazépines de type périphérique (PTBR)

Une augmentation de l'expression cérébrale de PTBR survient dans de nombreux syndromes hyperammonémiques dont les désordres congénitaux du cycle de l'urée (Rao et al., 1993), l'insuffisance hépatique chronique chez le rat (Desjardins et al., 1999a) ou chez l'homme (Lavoie et al., 1990) de même que chez la souris normale par suite de l'administration d'ammoniaque (Itzhak et al., 1995). Un rôle direct de l'ammoniaque dans l'induction de PTBR est également démontré par l'augmentation du nombre de sites de

liaison spécifiques de PTBR suite à l'exposition de cultures d'astrocytes à des concentrations pathophysiologiques d'ammoniaque (Itzhak et Norenberg, 1994a).

Une élévation de l'ARNm codant pour PTBR accompagnée d'une augmentation du nombre de sites de liaison pour le [^3H]PK11195 et le [^3H]Ro5-4864, deux ligands spécifiques de PTBR, ont été rapportées dans le cerveau de souris ayant une IHA causée par l'administration de thioacétamide (Itzhak et al., 1995; Kadota et al., 1996). Cependant, comme nous l'avons mentionné plus tôt, les résultats des études portant sur les conséquences cérébrales de l'IHA causée par cette drogue doivent être interprétés avec prudence puisque la thioacétamide est neurotoxique et cause une perte neuronale. Or, PTBR est fortement exprimé par les cellules de la cicatrice gliale se formant en réponse à la neurodégénération, d'où son utilisation par certains comme marqueur de la gliose (Miyazawa et al., 1995; Weissman et Raveh, 2003; Weissman et al., 2004). Des études supplémentaires utilisant un autre modèle seraient donc nécessaires afin de déterminer avec certitude s'il y a induction de PTBR lors de l'IHA en absence de mort neuronale.

4.7 Aquaporine-4

La famille des aquaporines sont des canaux osmotiques impliqués entre autres dans l'homéostasie du volume cérébral et la production du liquide céphalo-rachidien (Sulyok et al., 2004). Parmi les différents isoformes de la famille des aquaporines, la protéine aquaporine-4 est la plus abondante dans le parenchyme cérébral et est principalement exprimée au niveau des prolongements astrocytaires périvasculaires et subarachnoïdes (Nagelhus et al., 2004). Certaines études suggèrent que des changements de l'expression de l'aquaporine-4 puissent être impliqués dans l'œdème cérébral causé par le traumatisme cérébral (Vizuete et al., 1999) et l'ischémie cérébrale (Taniguchi et al., 2000).

De façon analogue, l'aquaporine-4 pourrait contribuer à l'œdème cérébral lors de l'IHA puisqu'une augmentation de l'expression de celle-ci a été rapportée dans un modèle d'IHA chez le rat (Margulies et al., 1999). Cette hypothèse est appuyée par une récente étude démontrant une augmentation progressive de l'expression de l'aquaporine-4 en parallèle avec l'apparition du gonflement cellulaire dans des cultures d'astrocytes exposées à l'ammoniaque (Rama Rao et al., 2003a).

5. Traitements de l'insuffisance hépatique aiguë

5.1 Transplantation hépatique

La transplantation hépatique est le seul traitement efficace de l'IHA pouvant améliorer le taux de survie des patients de façon significative, soit entre 60 et 70% de 1 à 3 ans après la transplantation hépatique (Rahman et Hodgson, 2001). Plus récemment, afin de pallier au manque chronique d'organes, une nouvelle technique de transplantation auxiliaire partielle du foie a été développée. Cette technique se base sur la capacité unique du foie de se régénérer et consiste en la résection partielle du foie malade combinée à la transplantation d'une greffe de foie de dimension réduite. Cette dernière assure la fonction hépatique normale pendant la période requise pour la régénération du foie malade, après quoi, l'élimination des traitements immunosuppresseurs entraîne l'atrophie de la greffe (Gubernatis et al., 1991). Les patients n'ont donc pas à prendre d'immunosuppresseurs à vie, ce qui constitue un avantage important de cette technique par rapport à la transplantation hépatique classique. La transplantation auxiliaire partielle du foie est associée à un taux de survie de 63 %, ce qui est comparable à la transplantation hépatique orthotopique (Chenard-Neu et al., 1996).

Bien que la transplantation hépatique soit d'une utilité indéniable pour le traitement de l'IHA, le manque chronique d'organes disponibles limite son utilisation. On estime en effet qu'entre 30 et 40 % des patients en attente d'une transplantation hépatique décèdent faute d'un organe compatible (Jalan et al., 2002a). D'autre part, dans les pays en voie de développement, où l'incidence de l'hépatite virale est souvent élevée, cette option de traitement est pratiquement inexistante en raison du manque d'expertise ou de ressources. D'autres solutions de traitement ou, à tout le moins, de stabilisation des patients visant à prolonger leur survie dans l'espoir d'une régénération hépatique spontanée sont donc nécessaires.

5.2 Réduction des niveaux plasmatiques d'ammoniaque

5.2.1 Lactulose

L'administration de lactulose dans le but de réduire les niveaux plasmatiques d'ammoniaque est un traitement couramment utilisé pour atténuer l'EH associée à la maladie chronique du foie. Cependant, chez les patients atteints d'IHA, l'administration de lactulose n'est pas un traitement efficace (Jalan, 2003), probablement en raison de l'évolution très rapide de la maladie.

5.2.2 L-ornithine L-aspartate

L'administration d'un mélange des acides aminés L-ornithine et L-aspartate réduit les niveaux sanguins d'ammoniaque et produit une diminution de la sévérité de l'encéphalopathie associée à la maladie chronique du foie (Kircheis et al., 1997). L-ornithine et l'aspartate stimulent la détoxification de l'ammoniaque en fournissant les substrats nécessaires pour la synthèse de la glutamine (principalement dans le muscle) et de l'urée (dans les cellules hépatiques fonctionnelles). Aucune étude évaluant l'efficacité de ce

traitement chez des patients atteints d'IHA n'est encore disponible, mais il a été démontré que l'administration de L-ornithine L-aspartate diminue la concentration plasmatique d'ammoniaque et prévient l'œdème cérébral dans un modèle animal d'IHA (Rose et al., 1999b).

5.3 Mannitol

Le mannitol demeure le traitement le plus couramment utilisé pour le contrôle des épisodes d'hypertension intracrânienne. Le mannitol est administré sous forme de bolus de 1 à 2 mg/kg afin d'augmenter l'osmolarité des capillaires sanguins cérébraux et favoriser le mouvement d'eau du cerveau vers la circulation sanguine (Jalan, 2003). L'utilisation de ce traitement augmente de beaucoup les chances de survie des patients atteints d'IHA puisque seulement 5,9 % des patients ne recevant pas de mannitol survivent contre un taux de survie de 47,1 % chez ceux en recevant (Canalese et al., 1982). Il est cependant important de noter que ce traitement est contre-indiqué chez les patients ayant une insuffisance rénale, une complication fréquente de l'IHA, puisque l'incapacité à éliminer efficacement le mannitol peut causer l'hyperosmolarité et une surcharge de fluides pouvant exacerber l'œdème cérébral.

5.4 Normalisation des paramètres hémodynamiques cérébraux

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, une augmentation du flot sanguin cérébral peut contribuer à l'œdème cérébral. Par conséquent, plusieurs stratégies visant à diminuer le flot sanguin cérébral lors de l'IHA sont à l'étude.

5.4.1 Hyperventilation

L'hyperventilation cause une vasoconstriction de la vasculature cérébrale et permet de restaurer l'autorégulation du flot sanguin cérébral chez des patients ayant une IHA (Strauss et al., 1998). L'hyperventilation peut ainsi s'avérer efficace pour diminuer la pression intracrânienne de façon aiguë, mais son utilisation prolongée n'est pas recommandée car elle pourrait induire l'hypoxie cérébrale.

5.4.2 Thiopental de sodium

L'administration de thiopental de sodium cause également une vasoconstriction cérébrale et produit une diminution de la pression intracrânienne (Forbes et al., 1989). Cependant, le thiopental de sodium cause d'importants dérangements hémodynamiques et n'est utilisé que chez des patients ne répondant pas aux traitements conventionnels.

5.4.3 Indométhacine

L'indométhacine induit la vasoconstriction cérébrale et réduit la pression intracrânienne chez des patients atteints d'IHA (Clemmesen et al., 1997; Tofteng et Larsen, 2004). Cependant, l'indométhacine est toxique pour les reins et l'intestin, ce qui limite son utilisation lors de l'IHA (Jalan, 2003).

5.5 Contrôle de la réponse inflammatoire systémique

S'il est devenu évident que la réponse inflammatoire systémique contribue aux complications de l'IHA, l'importance relative de la susceptibilité à l'infection par rapport à la relâche de cytokines pro-inflammatoires par le foie nécrotique reste inconnue. D'une part, la présence d'infection chez les patients atteints d'IHA augmente la sévérité de l'encéphalopathie et est associée à un taux de mortalité plus élevé, suggérant que

l'administration d'antibiotiques puisse avoir un effet bénéfique. D'autre part, dans certaines situations d'urgence où l'état d'un patient en attente d'une greffe de foie s'aggrave, l'ablation complète du foie malade permet de stabiliser l'état cardiovasculaire et cérébrovasculaire du patient (Ringe et al., 1993; Jalan et al., 2002b). Il a été suggéré que cet effet soit attribuable à la réduction des cytokines pro-inflammatoires relâchées par le foie nécrotique (Jalan et al., 2002b), mais il est important de noter que la température corporelle chute de près de 2 °C suite à l'hépatectomie ce qui, comme nous le verrons un peu plus loin, pourrait également expliquer la diminution de la pression intracrânienne suite à l'ablation du foie. Pour des raisons évidentes, l'hépatectomie ne peut cependant être utilisée que dans des situations désespérées où aucun autre traitement n'est efficace.

5.6 Foie artificiel et bioartificiel

Plusieurs systèmes de support de la fonction hépatique ont été développés dans le but de prolonger la survie des patients atteints d'IHA en attente d'une transplantation hépatique ou dans l'espoir d'une régénération hépatique spontanée. Certains systèmes dits bioartificiels font usage d'hépatocytes viables (le plus souvent provenant de porcs) contenus dans un bioréacteur à travers lequel circule le sang du patient. Les principaux problèmes associés à ces systèmes de support bioartificiels du foie sont la difficulté à obtenir de grandes quantités d'hépatocytes nécessaires à maintenir la fonction hépatique minimale nécessaire et l'incertitude quant aux risques liés à l'utilisation d'hépatocytes de porcs chez l'homme.

Parmi les systèmes de foie artificiels (ne faisant pas usage d'hépatocytes), le MARS (« Molecular Adsorbent Recirculating System »), qui fait appel à un système de dialyse des substances liées à l'albumine en combinaison avec l'hémodialyse traditionnelle, est le plus

prometteur. Malgré la recherche intensive dans ce domaine, l'efficacité des systèmes artificiels et bioartificiels de support de la fonction hépatique reste controversée et devra être démontrée à l'aide d'études cliniques contrôlées (Jalan et al., 2004b).

5.7 Hypothermie

Plusieurs études expérimentales démontrent un effet neuroprotecteur de l'hypothermie légère appliquée localement au cerveau pendant ou après l'ischémie cérébrale (Krieger et Yenari, 2004) de même qu'à la suite du traumatisme cérébral chez le rat (Dietrich et al., 1994). De plus, des études cliniques contrôlées randomisées démontrent une réduction de la pression intracrânienne et un meilleur rétablissement grâce à l'utilisation de l'hypothermie légère (32-33 °C) chez des patients suite à un traumatisme cérébral fermé (Clifton et al., 1993; Marion et al., 1997). Au cours des dernières années, un intérêt grandissant a été porté aux effets protecteurs de l'hypothermie légère sur les complications systémiques et cérébrales associées à l'IHA.

5.7.1 Effets protecteurs sur la fonction cérébrale

Peignoux et al. (1982) furent les premiers à démontrer un effet protecteur de l'hypothermie légère sur la survie de rats suite à la résection ou la dévascularisation hépatique complète. De nombreuses études expérimentales ont par la suite contribué à la compréhension des mécanismes responsables de l'effet neuroprotecteur de l'hypothermie lors de l'IHA et ce traitement est maintenant utilisé avec succès afin de prolonger la vie de patients en attente d'une transplantation hépatique (Jalan et al., 1999; Jalan et al., 2001). Parmi les effets bénéfiques de l'hypothermie dans le modèle animal de dévascularisation hépatique chez le rat, on observe entre autres un ralentissement l'apparition des symptômes de l'encéphalopathie hépatique, une diminution de la concentration

d'ammoniaque dans le liquide céphalo-rachidien et la prévention l'apparition de l'œdème cérébral. L'ensemble de nos connaissances actuelles sur les effets bénéfiques de l'hypothermie légère dans les modèles expérimentaux de même que chez les patients ayant une IHA sont résumées dans le tableau 1.3.

5.7.2 Effets protecteurs sur la fonction hépatique

En plus de ses effets protecteurs sur la fonction cérébrale lors de l'IHA, il semble que l'hypothermie ait également un effet protecteur sur le foie lui-même. Il a en effet été démontré que l'hypothermie diminue la demande métabolique en oxygène et réduit le dommage hépatique causé par l'ischémie-reperfusion chez le porc (Nagano et al., 1990; Heijnen et al., 2003). De façon similaire, chez la souris, l'hypothermie diminue le dommage hépatique causé par l'ischémie suivie de la reperfusion du foie grâce à une diminution de la réponse inflammatoire hépatique (Kato et al., 2002) et à une diminution du stress oxydatif (Khandoga et al., 2003) par rapport aux animaux normothermiques. Plus récemment, nous avons également démontré un effet protecteur de l'hypothermie légère sur la nécrose hépatique causée par l'administration d'acétaminophène chez la souris (Vaquero et al., 2004a).

Cadre expérimental	Effet de l'hypothermie	Référence
<ul style="list-style-type: none"> • Rat • Dévascularisation hépatique 	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration des symptômes de l'encéphalopathie • Réduction de l'œdème cérébral 	(Traber et al., 1989)
<ul style="list-style-type: none"> • Rat • Dévascularisation hépatique 	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration des symptômes de l'encéphalopathie • Prévention de l'œdème cérébral • Réduction de la [ammoniaque] dans le LCR • Diminution de la [glutamate] extracellulaire cérébrale 	(Rose et al., 2000)
<ul style="list-style-type: none"> • Rat • Dévascularisation hépatique 	<ul style="list-style-type: none"> • Prévention de l'œdème cérébral • Amélioration des symptômes de l'encéphalopathie • Diminution de la [lactate] dans le LCR 	(Chatauret et al., 2001)
<ul style="list-style-type: none"> • Rat • Dévascularisation hépatique 	<ul style="list-style-type: none"> • Normalisation de la concentration cérébrale de glutamate et d'aspartate • Normalisation (baisse) de la synthèse <i>de novo</i> de lactate et d'alanine 	(Chatauret et al., 2003)
<ul style="list-style-type: none"> • Rat • Dévascularisation hépatique 	<ul style="list-style-type: none"> • Atténuation de la baisse des niveaux cérébraux des osmolytes taurine et myo-inositol 	(Zwingmann et al., 2004)
<ul style="list-style-type: none"> • Rat • Anastomose porto-cave + infusion d'ammoniaque 	<ul style="list-style-type: none"> • Réduction de l'œdème cérébral et de la pression intracrânienne • Normalisation (baisse) du flot sanguin cérébral 	(Cordoba et al., 1999)
<ul style="list-style-type: none"> • Patients ayant une IHA 	<ul style="list-style-type: none"> • Baisse de la pression intracrânienne • Baisse du flot sanguin cérébral • Hausse de la pression de perfusion cérébrale • Baisse de la concentration artérielle d'ammoniaque • Baisse de la capture cérébrale d'ammoniaque 	(Jalan et al., 1999)
<ul style="list-style-type: none"> • Patients ayant une IHA 	<ul style="list-style-type: none"> • Baisse de la pression intracrânienne • Baisse du flot sanguin cérébral • Rétablissement de l'autorégulation du flot sanguin cérébral 	(Jalan et al., 2001)
<ul style="list-style-type: none"> • Patients ayant une IHA 	<ul style="list-style-type: none"> • Baisse de la concentration artérielle des cytokines pro-inflammatoires TNFα, IL-1β et IL-6 • Baisse de relâche des cytokines pro-inflammatoires TNFα, IL-1β et IL-6 par le cerveau • Baisse des niveaux artériels de marqueurs du stress oxydatif (malonyldialdéhyde et nitrates/nitrites) 	(Jalan et al., 2004a)

Tableau 1.3 Effets de l'hypothermie légère lors de l'IHA

6. Buts de l'étude proposée

Afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes pathophysiologiques responsables des complications cérébrales associées à l'IHA, nous avons entrepris l'étude des changements de l'expression génique du SNC survenant lors de l'IHA. Les objectifs de la présente étude sont donc, dans un premier lieu :

- d'identifier et de caractériser certains changements d'expression survenant lors de l'IHA expérimentale, et
- d'évaluer les conséquences possibles de ces changements d'expression sur la fonction du SNC

Pour ce faire nous avons utilisé un modèle expérimental d'IHA très bien caractérisé par notre unité de recherche soit le rat ayant une dévascularisation hépatique complète. Il s'agit d'un modèle éprouvé pour l'étude des complications neurologiques de l'IHA puisqu'il cause, de façon très reproductible, une encéphalopathie hépatique progressive dont les stades peuvent être évalués par un examen sommaire, accompagnée d'un œdème cérébral.

L'utilisation d'animaux modifiés génétiquement (« knock-outs », animaux transgéniques) permettrait de mieux comprendre les conséquences des changements de l'expression génique du SNC survenant lors de l'IHA. Cependant, l'absence d'un modèle expérimental adéquat d'IHA chez la souris limite présentement l'élaboration d'études faisant appel à ces technologies. Dans un deuxième volet, la présente étude a donc pour but de :

- caractériser, d'un point de vue neurologique, un nouveau modèle d'IHA causée par la toxine hépatique azoxyméthane (AOM) chez la souris, et
- d'évaluer les effets de l'hypothermie légère dans ce modèle d'IHA.

CHAPITRE 2 :

PARTIE 1 :

MODIFICATIONS DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL LORS DE L'INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGÜE

Article 1:

Loss of Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein in Acute Hyperammonemia

Neurochemistry International (2002), 41(2-3), 155-160.

Mireille Bélanger, Paul Desjardins, Nicolas Chatauret and Roger F. Butterworth

Unité de Recherche en sciences neurologiques, Hôpital Saint-Luc (CHUM), Montréal,

Québec, Canada, H2X 3J4

Abstract

GFAP is a major component of the glial filament network and alterations in expression of this protein have been reported in response to acute ammonia exposure *in vitro*. In order to determine the effects of acute hyperammonemia on GFAP expression, brain extracts from rats with acute liver failure due to hepatic devascularization (portacaval anastomosis followed 24 h. later by hepatic artery ligation) were analyzed for GFAP mRNA using RT-PCR and appropriate oligonucleotide primers. GFAP protein was assayed by immunoblotting using a polyclonal antibody. Hepatic devascularization resulted in a significant 55-68% decrease ($p<0.01$) of GFAP mRNA and a concomitant loss of GFAP protein at precoma and coma stages of encephalopathy when brain water content was significantly increased and brain ammonia concentrations were in the millimolar range. Expression of a second glial filament protein S-100 β were unaffected by acute hyperammonemia. These findings suggest a role for GFAP in cell volume regulation and that loss of GFAP expression could contribute to the pathogenesis of brain edema in acute hyperammonemic syndromes.

Introduction

Acute hyperammonemia resulting from fulminant (or acute) liver failure is associated with alterations in expression of genes coding for key astrocytic proteins in brain (Butterworth, 2001). Such proteins include the peripheral-type benzodiazepine receptor (Desjardins et al., 2001); the glutamate transporter GLT-1 (Knecht et al., 1997); the glycine transporter (GLYT-1) (Zwingmann et al., 2001) and the water channel protein, aquaporin IV (Margulies et al., 1999).

Glial fibrillary acid protein (GFAP) is a 50 KDa intracytoplasmic filamentous protein that constitutes the major component of intermediate filaments in differentiated astrocytes of the central nervous system (Eng et al., 2000). Among other functions, GFAP modulates astrocyte motility and shape by providing structural stability to astrocytic processes. GFAP represents the most specific astrocytic marker under normal and pathological conditions and antisera to GFAP are routinely used to identify astrocytes in tissue sections. Alterations of GFAP immunolabelling have been described in experimental (Norenberg, 1977; Suarez et al., 1996) and human (Sobel et al, 1981; Kretzschmar et al., 1985; Kimura and Budka, 1986) hepatic encephalopathy, a disorder associated with chronic hyperammonemia and pathological changes to astrocytes in brain generally referred to as Alzheimer type II astrocytosis, a term first coined by von Hösslin and Alzheimer in 1912. In contrast to chronic hyperammonemia, the effects of acute hyperammonemia on GFAP expression have not been systematically studied. The aim of the present investigation, therefore, was the assessment of GFAP mRNA and protein expression in brain in a well-characterized experimental model of acute hyperammonemia, the hepatic devascularized rat.

Experimental procedures

Animal surgery

Male Sprague-Dawley rats (175-200 g) were anesthetized with halothane, and an end-to-side portacaval anastomosis was performed according to the guidelines of Lee and Fisher (1961). Rats underwent a laparotomy, the inferior vena cava and portal vein were isolated and clamped using anastomosis clamp (Roboz Instruments Inc, Washington D.C.) and an elliptical portion of the vein 1.5 times the diameter of the portal vein was removed. The portal vein was ligated and cut, and an end-to-side anastomosis was performed under a dissecting microscope. Total surgery time was <15 min. Sham-operated control rats, matched for weight, were similarly anesthetized and the inferior vena cava was clamped for 15 min. Following surgery all animals were individually housed with free access to food and water under constant conditions of temperature, humidity, and light cycles.

Forty-eight hours after portacaval anastomosis or laparotomy, rats were reanesthetized and subjected to hepatic artery ligation (HAL) and either sacrificed 6 h after HAL or allowed to proceed to precoma stages (loss of righting reflex) and coma stages (loss of corneal reflex) of encephalopathy. All the above surgical methods were in accordance with the Guidelines of Canadian Council of Animal care and were approved by Animal Research Committee at Saint-Luc Hospital (C.H.U.M.).

Tissue Sampling

Groups of rats were sacrificed by decapitation. Brains were rapidly removed, dissected on ice and were immediately frozen in isopentane. All tissues were stored at -70°C until use.

Brain water measurement

One cerebral hemisphere was kept at 4°C and brain water measured at coma stages of encephalopathy. The brain was cut into 2-mm slices, and 1-mm punch biopsy specimens were obtained from the gray matter of the cerebral cortex. Water content of each specimen was measured gravimetrically using a density gradient of bromobenzene-kerosene precalibrated with K_2SO_4 as previously described (Marmarou et al., 1978). The cortical samples were placed onto the fluid column, and the equilibration point was measured within 2 min. The specific gravity of the tissue was calculated and results were expressed as percentage of water content. Eight measurements were made per animal, and values were arithmetically averaged.

Western blot analysis

Tissues were homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer, and a protease inhibitor mixture consisting of 1 mM EDTA, 0.1 μM pepstatin A, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, and 100 $\mu\text{g/ml}$ phenylmethyl-sulfonyl fluoride. After centrifugation at 12,000 g for 45 min, proteins (40 μg) were boiled for 5 min in loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol; 2% sodium dodecyl sulfate, 0.1 M dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue). Proteins were resolved by 8% denaturing SDS-polyacrylamide gels

and transferred overnight to PVDF membranes. The membranes were blocked for 2 h in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% dry milk and 0.1% Tween 20, then incubated for 1 h with a goat polyclonal antibody (0.2 µg/ml) directed against GFAP (Santa Cruz Biotechnology, CA). The blots were subsequently probed with anti-goat horseradish peroxidase-conjugated antiserum (Promega, Madison, WI) diluted 1/10 000 in the same buffer. After extensive washing with TBS, the peroxidase activity was detected by chemiluminescence using the ECL detection system (Amersham, Arlington Heights, IL).

RNA extraction

Total RNA was extracted using TRI Reagent (MRC Inc., Ohio) according to the manufacturer's protocol. Putative contaminating DNA was eliminated by adding 100 U of RNase-free DNase I per 50 µg of total RNA at 37°C for 1 h. Purified RNA was then extracted with phenol, precipitated with ethanol and resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water. RNA samples were stored at -70°C until use.

RT-PCR analysis

GFAP and S-100β expression were measured by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). β-Actin was used as an internal standard to monitor loading variations. Total RNA (1 µg) was mixed with 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.01%(w/v) bovine serum albumin, 100 µM dNTPs, primers at 1 µM each, AMV reverse transcriptase (80 U/ml), *Taq* DNA polymerase (20 U/ml) and 50 µCi/ml [α^{32} P]dCTP (3000 Ci/mmol), in a total reaction volume of 50 µl. The reactions were initially heated at 50°C for 15 min followed by PCR at 95°C for 30 sec, 60°C for 45

sec and 72°C for 1 min. Amplification efficiency conditions were determined after a kinetic study, to ensure all experiments were performed within the exponential phase of amplification where PCR product remains proportional to initial template concentration (data not shown). *β-Actin*, *GFAP* and *S-100β* mRNAs were amplified for 18, 19 and 25 cycles respectively. After amplification, the samples were electrophoresed onto 8% polyacrylamide gels, dried, autoradiographed at -70°C with an intensifying screen. Each band was excised and Cerenkov radiation was quantitated using a β-counter. Oligonucleotide primers were designed using the PRIME program (Genetic Computer Group, Wisconsin) and synthesized by the Sheldon Biotechnology Center (McGill University, Quebec) based on the following GeneBank accession numbers: X00351 (β-Actin, Nudel et al., 1983), M91652 (GFAP, Feinstein et al., 1992) and X01090 (S100β, Kuwano et al., 1984). The forward and reverse primer sequences were as follows: CATCCCCCAAAGTTCTAC and CCAAAGCCTTCATACATC (β-Actin, 347bp); ACATCGA GATCGCCACCTAC and ACATCACATCCTTGTGCTCC (GFAP, 219bp); ATGTCTGAGCTGGAGAAGG and GAACTCATGACAGGCTGTG (S100-β, 264bp). The specificity of the oligonucleotide primers was verified using the program BLASTN (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences between groups were evaluated by the post-hoc Turkey Test. A p value <0.05 was considered to indicate a significant difference.

Results

Brain water content in the frontal cortex of ALF rats are shown in Table 1. Hepatic devascularization resulted in significant 1.8% and 2.7% increases ($p<0.01$) in brain water content at precoma and coma stages of encephalopathy, respectively. Brain water content was not altered at the earlier time point (HAL-6h) following hepatic devascularization.

Rats	Brain water (%)
Sham	80.26 +/- 0.22
HAL-6h	80.50 +/- 0.19
Precoma	81.74 +/- 0.25*
Coma	82.46 +/- 0.06*

Table 1. Brain water content in rats with ALF resulting from hepatic devascularization compared to sham-operated controls. Precoma and coma time points are defined as loss of righting and corneal reflexes, respectively. Data expressed as mean values +/- S.D. of duplicate determinations from 8 rats per group. Values significantly different from sham-operated controls at each time point indicated by * $p<0.01$ by ANOVA; HAL, hepatic artery ligation.

RT-PCR analysis revealed a significant 45% decrease ($p<0.05$) in the steady state level of GFAP mRNA occurring as early as 6h following hepatic devascularization with further decrease (55-68%, $p<0.01$) occurring at precoma and coma stages of encephalopathy (Figure 1). The loss of GFAP mRNA following hepatic devascularization was selective since expression of the mRNA encoding the glial filament S-100 β was unchanged in ALF rats (Figure 2).

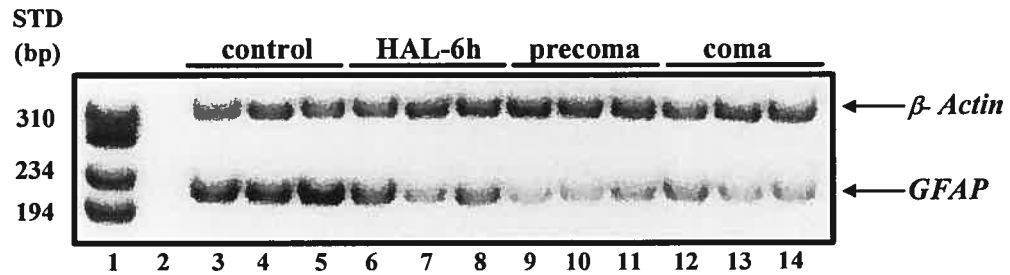


Figure 1. Decreased expression of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) mRNA in the brains of rats with acute liver failure. Total RNA was extracted from the frontal cortex of rats with acute liver failure at coma (lanes 12-14) and precoma (lanes 9-11) stages of encephalopathy, 6 hours following hepatic artery ligation (HAL-6h; lanes 6-8) or from sham-operated controls (lanes 3-5). β -Actin (347bp) and GFAP (219bp) were reverse-transcribed and amplified by PCR for 18 and 19 cycles, respectively. Lane 1: molecular weight standards (bp); lanes 2: AMV reverse transcriptase was omitted (as a negative control) from the reaction mixture.

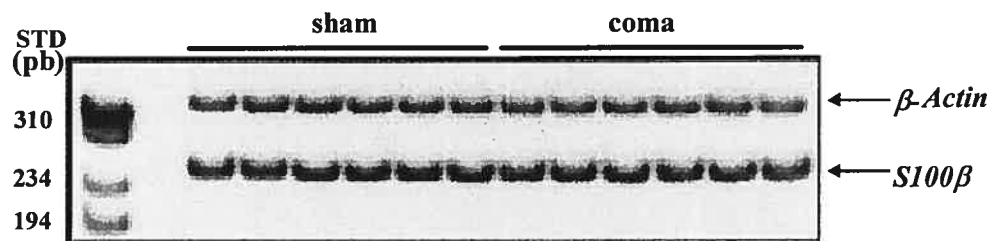


Figure 2. Expression of S-100 β mRNA in the brains of rats with acute liver failure. Total RNA was extracted from the frontal cortex of rats with acute liver failure at coma stages of encephalopathy (lanes 9-14) or from sham-operated controls (lanes 3-8). β -Actin (347bp) and S-100 β (270bp) were reverse-transcribed and amplified by PCR for 17 and 25 cycles, respectively. Lane 1: molecular weight standards (bp); lanes 2: AMV reverse transcriptase was omitted (as a negative control) from the reaction mixture.

Effect of ALF on GFAP protein in cerebral cortex is shown in Figure 3. As can be seen, GFAP expression was unchanged 6 h following hepatic devascularization (HAL-6h), in spite of a downregulation of the GFAP mRNA (Figure 1). However, ALF resulted in a significant 43% and 58% decreases ($p<0.05$) in GFAP expression at precoma and coma stages of encephalopathy, respectively. These findings suggest that the loss of GFAP expression results primarily from decreased transcription or decreased stability of the GFAP mRNA.

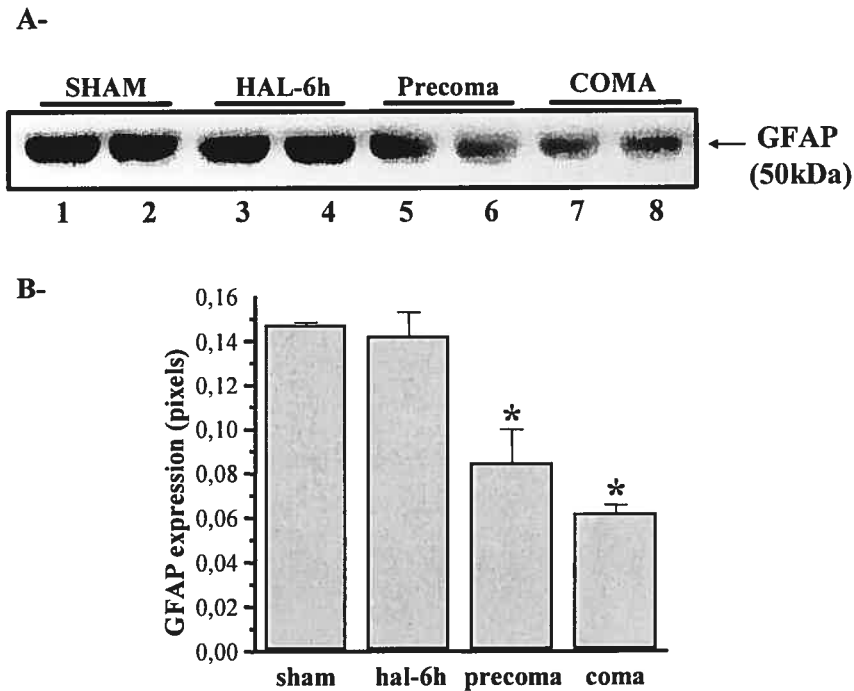


Figure 3. GFAP protein expression in the brains of rats with acute liver failure. A- Proteins were extracted from the frontal cortex of rats at different time points following hepatic artery ligation (HAL) and probed by western blot with a polyclonal antibody against GFAP. Lanes 1-2: sham-operated controls; lanes 3-4: HAL-6h (no signs of encephalopathy); lanes 5-6: precoma (loss of righting reflex); lanes 7-8: coma (loss of corneal reflex). B- Schematic representation of the data shown in panel A; HAL: hepatic artery ligation.

Discussion

Results of the present study reveal a significant loss in expression of GFAP mRNA and protein in frontal cortical extracts from rats with acute hyperammonemia resulting from hepatic devascularization. Reduced expression of GFAP occurred at both precoma and coma stages of encephalopathy and was selective; concomitant expression of a second protein constituent of glial filaments, S-100 β , was unchanged. Reduced GFAP gene expression in this model of acute hyperammonemia occurred at brain ammonia concentrations in the millimolar range confirming previous reports where it was demonstrated that exposure of primary rat cortical astrocytes to millimolar ammonia concentrations led to a destabilization of GFAP mRNA (Neary et al., 1994) and to a concomitant loss of GFAP protein expression (Norenberg et al., 1990; Haghighat et al., 2000).

Previous reports described significant alterations of GFAP immunolabelling of astrocytes in experimental and human chronic liver failure, a condition which is associated with moderate degrees of hyperammonemia. However, the findings are somewhat inconsistent. For example, GFAP-immunolabelled astrocytes were found to be decreased in number in cerebral cortex of rats with chronic liver failure resulting from portacaval anastomosis (shunting) (Norenberg, 1977). However, longer periods of shunting led to either increases or decreases in GFAP immunostaining of astrocytes depending upon their proximity to blood capillaries or adjacent neuronal elements (Suarez et al., 1996; 1998). Similarly, in human chronic liver failure, GFAP immunolabelled cells were reportedly decreased in basal ganglia,

cerebral cortex and thalamic structures (Sobel et al., 1981). However, a more recent study revealed that GFAP immunolabelling of cerebellar Bergmann glia in human chronic liver failure was unchanged (Kril et al., 1997). The explanation for these inconsistencies is unknown at the present time but may relate to the well established heterogeneity of astrocytic metabolism and function in the mammalian brain (Hansson 1988). Chronic hyperammonemic states resulting from chronic liver failure or from congenital urea cycle disorders are associated with a characteristic alteration in astrocytic morphology known as Alzheimer type II astrocytosis in which astrocytes manifest a large, swollen nucleus, prominent nucleolus, margination of their chromatin pattern and glycogen deposition (von Hösslin and Alzheimer, 1912; Norenberg, 1977; Horita et al., 1981). Sobel et al. (1981) reported that the Alzheimer type II change was associated with a loss of expression of GFAP in cerebral gray matter in structures in 10 cases of end-stage chronic liver failure. Both the degree and frequency of GFAP-immunostained cells were decreased throughout basal ganglia, thalamus and cerebral cortex. However, a more recent study could find no significant correlation between Alzheimer type II changes and GFAP immunolabelling intensity in Bergmann glial cells in sections of cerebellar vermis from 15 similar cases (Kril et al., 1997). Increased GFAP-immunolabelling has been described in hypothalamic (Suarez et al., 1996) and hippocampal (Suarez et al., 1998) structures of rats with chronic hyperammonemia resulting from chronic liver failure (portacaval anastomosis). However, it is unclear whether or not portacaval anastomosis is associated with Alzheimer type II changes or not (Cavanagh et al., 1972; Pilbeam et al., 1983). Results of the present study clearly show a significant

loss of GFAP mRNA and protein in an experimental animal model of acute liver failure in which astrocytic swelling and brain edema (rather than Alzheimer type II changes) are the characteristic neuropathologic feature (Ganz et al., 1989). Together with the report of Kril et al. (1997), these findings do not support the contention that alterations in expression of GFAP are a mandatory component of the Alzheimer type II change.

Astrocytic swelling may be sufficiently severe to cause brain edema, the complications of which (intracranial hypertension, brainstem herniation) are the major causes of death in acute liver failure. The occurrence of brain edema is significantly correlated with arterial ammonia concentrations in acute liver failure (Clemmensen et al., 1999). Results of the present study suggest that the loss of GFAP may be implicated in the pathogenesis of the astrocytic swelling which is characteristic of acute hyperammonemia. Consistent with this possibility is the report that the cytoskeletal network, of which GFAP is a key component, is implicated in cell volume regulation (Cornet et al., 1993). Additional studies in mice deficient for both GFAP and vimentin have shown altered astrocytic taurine release following hypotonic stress (Ding et al., 1998) provides further evidences for a role of the cytoskeleton in astrocyte volume regulation and the involvement of intermediate filaments in this process. Furthermore, exposure of cultured astrocytes to ammonia results in cell swelling and a concomitant loss of GFAP expression (Norenberg et al., 1990; Norenberg et al., 1991) suggesting that GFAP content of the cell may determine its viscoelastic properties.

In conclusion, acute hyperammonemia resulting from hepatic devascularization leads to a significant loss of GFAP gene and protein expression at precoma and coma stages of encephalopathy. Loss of GFAP expression in this model of acute hyperammonemia occurs when brain ammonia concentrations are in the millimolar range and correlates with increase brain water content. These findings are consistent with a role for GFAP in the pathogenesis of brain edema in acute hyperammonemia.

References

- Butterworth, R.F., 2001. Neurotransmitter dysfunction in hepatic encephalopathy: new approaches and new findings. *Met. Brain Dis.* (in press).
- Cavanagh, J.B., Lewis, P.D., Blakemore, W.F., Kyu, M.H., 1972. Changes in the cerebellar cortex after portacaval anastomosis. *J. Neurol. Sci.* 15, 13-26.
- Clemmenson, J.O., Larsen, F.S., Kondrup, J., Hansen, B.A., Ott, P., 1999. Cerebral herniation in patients with acute liver is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology*, 29, 648-653.
- Cornet, M., Ubl, J., Kolb, H.A., 1993. Cytoskeleton and ion movements during volume regulation in cultured PC12 cells. *J. Membr. Biol.* 133, 161-170
- Desjardins, P., Bélanger, M., Butterworth, R.F., 2001. Alterations in expression of genes coding for key astrocytic proteins in acute liver failure. *J. Neurosci. Res.* (in press).
- Ding, M., Eliasson, C., Betsholtz, C., Hamberger, A., Pekny, M., 1998. Altered taurine release following hypotonic stress in astrocytes from mice deficient for GFAP and vimentin. *Mol. Brain Res.* 62, 77-81.
- Eng, L.F., Ghirnikar R.S., Lee, Y.L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 25, 1439-1451.
- Feinstein, D.L., Weinmaster, G.A., Milner, R.J., 1992. Isolation of cDNA clones encoding rat glial fibrillary acidic protein: expression in astrocytes and in Schwann cells. *J. Neurosci. Res.* 32, 1-14.
- Ganz, R., Swain, M., Traber, P., DalCanto, M., Butterworth, R.F., Blei, A.T., 1989. Ammonia-induced swelling of rat cerebral cortical slices: implications for the pathogenesis of brain edema in acute hepatic failure. *Metab. Brain Dis.* 4, 213-223.

Haghighat, N., McCandless, D.W., Geraminegad, P., 2000. Response in primary astrocytes and C6-glioma cells to ammonium chloride and dibutyryl cyclic-AMP. *Neurochem. Res.* 25, 277-284.

Hansson, E., 1988. Astroglia from defined brain regions as studied with primary cultures. *Prog. Neurobiol.* 30, 369-397.

Horita, N., Matsushita, M., Ishii, T., Oyanagi, S., Sakamoto, K., 1981. Ultrastructure of Alzheimer type II glia in hepatocerebral disease. *Neuropathol. & Applied Neurobiol.* 7, 97-102.

Kimura, T., Budka, H., 1986. Glial fibrillary acidic protein and S-100 protein in human hepatic encephalopathy: immunocytochemical demonstration of dissociation of two glia-associated proteins. *Acta Neuropathol.* 70, 17-21.

Knecht, K., Michalak, A., Rose, C., Rothstein, J.D., Butterworth, R.F., 1997. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci. Lett.* 229, 201-203.

Kretschmar, H.A., DeArmond, S.J., Forno, L.S., 1985. Measurement of GFAP in hepatic encephalopathy by ELISA and transblots. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44, 459-471.

Kril, J.J., Flowers, D., Butterworth, R.F., 1997. Distinctive pattern of Bergmann glial pathology in human hepatic encephalopathy. *Mol. Chem. Neuropathol.* 31, 279-287.

Kuwano, R., Usui, H., Maeda, T., Fukui, T., Yamanari, N., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Takahashi, Y., 1984. Molecular cloning and the complete nucleotide sequence of cDNA to mRNA for S-100 protein of rat brain. *Nucleic Acids Res.* 12, 7455-7465.

Lee, S.H., Fisher, B., 1961. Portocaval shunt in the rat. *Surgery* 50, 668-672.

Margulies, J.E., Thompson, R.C., Demetriou, A.A., 1999. Aquaporin-4 water channel is up-regulated in the brain in fulminant hepatic failure (abstract). *Hepatology* 30, 395A.

Marmarou, A., Poll, W., Shulman, K., 1978. A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J. Neurosurg.* 49, 530-537.

Neary, J.T., Whittemore, S.R., Zhu, Q., Norenberg, M.D., 1994. Destabilization of glial fibrillary acidic protein mRNA in astrocytes by ammonia and protection by extracellular ATP. *J Neurochem.* 63, 2021-2027.

Norenberg, M.D., 1977. A light and electron microscopic study of experimental portal-systemic (ammonia) encephalopathy. *Laboratory Investigation* 36, 618-627.

Norenberg, M.D., Neary, J.T., Norenberg, L.O., McCarthy, M., 1990. Ammonia induced decreased in glial fibrillary acidic protein in cultured astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49, 399-405.

Norenberg, M.D., Baker, L., Norenberg, L.O., Blicharska, J., Bruce-Gregorios, J.H., Neary, J.T., 1991. Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem. Res.* 16, 833-838.

Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S., Levy, Z., Yaffe, D., 1983. The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res.* 11, 1759-1771.

Pilbeam, C.M., Anderson, R.M., Bhathal, P.S., 1983. The brain in experimental portal-systemic encephalopathy. I. Morphological changes in three animal models. *J. Pathol.* 140, 331-345.

Sobel, R.A., DeArmond, S.J., Forno, L.S., Eng, L.F., 1981. Glial fibrillary acid protein in hepatic encephalopathy. An immunohistochemical study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 40, 625-632.

Suarez, I., Bodega, G., Arilla, E., Fernandez, B., 1996. Long-term changes in glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase immunoreactivities in the supraoptic nucleus of portacaval shunted rats. *Metab. Brain Dis.* 11, 369-379.

Suarez, I., Bodega, G., Fernandez, B., 1998. Changes in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in response to experimental hepatic encephalopathy in the rat hippocampus. *Restorative Neurol. Neurosci.* 12, 49-54.

Von Hösslin, C. Alzheimer A., 1912. Ein Beitrag zur Klinik und pathologischen Anatomie der Westphal-Strümpellschen Pseudosklerose. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 8, 183-209

Zwingmann, C., Desjardins, P., Michalak, A., Hazell, A.S., Chatauret, N., Butterworth, R.F., 2001. Reduced expression of the astrocytic glycine transporter protein Glyt-1 in frontal cortex of rats with acute liver failure (abstract). *Hepatology* (in press).

Article 2:

Mild hypothermia prevents brain edema and attenuates up-regulation of the astrocytic benzodiazepine receptor in experimental acute liver failure

Journal of Hepatology (2005), 42(5), 694-9.

Mireille Bélanger, Paul Desjardins, Nicolas Chatauret, Christopher Rose and Roger F.

Butterworth

Unité de Recherche en sciences neurologiques, Hôpital Saint-Luc (CHUM), Montréal,

Québec, Canada, H2X 3J4

Abstract

Mild hypothermia has proven to be useful in the clinical management of patients with acute liver failure. Acute liver failure in experimental animals results in alterations in the expression of genes coding for astrocytic proteins including the “peripheral-type” (astrocytic) benzodiazepine receptor (PTBR), a mitochondrial complex associated with neurosteroid synthesis. To gain further insight into the mechanisms whereby hypothermia attenuates the neurological complications of acute liver failure, we investigated PTBR expression in the brains of hepatic devascularized rats under normothermic (37 °C) and hypothermic (35 °C) conditions. PTBR mRNA was measured using semi-quantitative RT-PCR in cerebral cortical extracts and densities of PTBR sites measured by quantitative receptor autoradiography. At coma stages of encephalopathy, animals with acute liver failure manifested a significant increase of PTBR mRNA levels and brain pregnenolone content and [³H]PK11195 binding site densities were concomitantly increased. Mild hypothermia prevented brain edema and significantly attenuated the increased receptor expression and pregnenolone content. These findings suggest that an attenuation of PTBR up-regulation resulting in the prevention of increased brain neurosteroid content represent one of the mechanisms by which mild hypothermia exerts its protective effects in ALF.

Introduction

Up-regulation of the peripheral-type (astrocytic) benzodiazepine receptor (PTBR) in the brain is a consistent finding in various hyperammonemic syndromes including acute and chronic liver failure (see (Bélanger et al., 2003) for review). Unlike the central benzodiazepine receptor which is expressed solely in the central nervous system (CNS) in association with GABA_A receptors, PTBR is found in the CNS as well as in various peripheral tissues and is not allosterically coupled to GABA_A receptors (Woods et Williams, 1996). In the CNS, PTBR is localized on the outer mitochondrial membrane (Anholt et al., 1986) of glial cells where it forms a heteromeric complex of three subunit proteins namely the isoquinoline carboxamide binding protein (IBP; 18 kDa), a voltage-dependent anion channel (VDAC; 32 kDa) and an adenine nucleotide carrier (ANC; 30 kDa) (McEnery et al., 1992).

PTBR has been implicated in a number of cellular functions including the regulation of cellular proliferation (Alho et al., 1994), heme biosynthesis (Taketani et al., 1995), immunomodulation (Woods et Williams, 1996) and regulation of the mitochondrial permeability transition pore and apoptosis (Castedo et al., 2002; Casellas et al., 2002). However, its role in steroidogenesis is probably the best characterized function of PTBR (Papadopoulos et al., 1997). PTBR mediates the transport of cholesterol to the inner mitochondrial membrane where it is metabolized to pregnenolone by the cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme. Pregnenolone is the precursor molecule for the synthesis of steroids, some of which are synthesized in the brain (Mellon et Griffin, 2002). It has been

suggested that increased production of neurosteroids with potent modulatory effects on GABAergic and glutamatergic neurotransmitter systems may lead to disturbances in excitatory and inhibitory neurotransmission and contribute to hepatic encephalopathy (HE) (Jones, 2002) and brain edema (Bender et Norenberg, 1998) in acute liver failure (ALF).

Previous studies conducted in animal models as well as in patients with ALF have demonstrated protective effects of mild hypothermia in this condition which significantly delays the onset of encephalopathy and prevents brain edema in rats with ALF due to hepatic devascularization (Rose et al., 2000). The present study was undertaken to determine the effects of mild hypothermia on PTBR expression in the brain of rats with ALF in order to provide better understanding of the role of the PTBR in the pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema, two major complication of ALF.

Materials and Methods

Animal surgery

Male Sprague-Dawley rats (175-200 g) were anesthetized with halothane, and an end-to-side portacaval anastomosis was performed according to the guidelines of Lee and Fisher (1961). Rats underwent a laparotomy, the inferior vena cava and portal vein were isolated and clamped using an anastomosis clamp (Roboz Instruments Inc, Washington D.C.) and an elliptical portion of the vein 1.5 times the diameter of the portal vein was removed. The portal vein was ligated and cut, and an end-to-side anastomosis was performed under a dissecting microscope. Total surgery time was <15 min. Sham-operated control rats, matched for weight, were similarly anesthetized and the inferior vena cava was clamped for 15 min. Following surgery all animals were individually housed with free access to food and water under constant conditions of temperature, humidity, and light

cycles. Twenty-four hours after portacaval anastomosis, rats were reanesthetized and subjected to hepatic artery ligation (HAL). Following HAL, body temperature was monitored and maintained at 37°C by means of heating pads (ALF-37). Hypothermia occurred spontaneously in the absence of external heating and body temperature was maintained at 35°C using heating pads when necessary (ALF-35). When coma stage of encephalopathy was reached (defined as the loss of righting and corneal reflexes), normothermic animals were sacrificed by decapitation and the brain was rapidly removed, dissected on ice and was immediately frozen in isopentane. All tissues were stored at -70°C until use. Hypothermic animals were sacrificed in parallel with comatose normothermic animals. All the above surgical methods were conducted in accordance with the Guidelines of Canadian Council of Animal care and were approved by Animal Research Committee at Saint-Luc Hospital (C.H.U.M.).

Brain water measurement

Brains were kept at 4°C and cut into 2-mm slices. 1-mm punch biopsy specimens were obtained from the gray matter of the cerebral cortex. Water content of each specimen was measured gravimetrically using a density gradient of bromobenzene-kerosene precalibrated with K₂SO₄ as previously described (Marmarou et al., 1978). The cortical samples were placed onto the fluid column, and the equilibration point was measured within 2 min. The specific gravity of the tissue was calculated and results were expressed as percentage of water content. Eight measurements were made per animal, and values were averaged.

RNA extraction

Total RNA was extracted using TRI Reagent (MRC Inc., Ohio) according to the manufacturer's protocol. Putative contaminating DNA was eliminated by adding 100 U of RNase-free DNase I per 50 µg of total RNA at 37°C for 1 h. Purified RNA was then extracted with phenol, precipitated with ethanol and resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water. RNA samples were kept at -70°C until use.

RT-PCR analysis

β-Actin was used as an internal standard to monitor loading variations. Total RNA (1 µg) was mixed with 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01%(w/v) bovine serum albumin, 100 µM dNTPs, primers at 1 µM each, AMV reverse transcriptase (80 U/ml), *Taq* DNA polymerase (20 U/ml) and 50 µCi/ml [α^{32} P]dCTP (3000 Ci/mmol), for a total reaction volume of 50 µl. The reactions were initially heated at 50°C for 15 min followed by PCR at 95°C for 30 sec, 62°C for 45 sec and 72°C for 1 min. Amplification efficiency conditions were determined after a kinetic study, to ensure all experiments were performed within the exponential phase of amplification where PCR product remains proportional to initial template concentration (data not shown). *β-Actin* and *PTBR* were amplified for 18 and 30 cycles respectively. After amplification, the samples were electrophoresed onto 9% polyacrylamide gels, dried, autoradiographed at -70°C with an intensifying screen. Each band was excised and Cerenkov radiation was quantitated using a β-counter. Oligonucleotide primers were designed using the PRIME program (Genetic Computer Group, Wisconsin) and synthesized by the Sheldon Biotechnology

Center (McGill University, Quebec) based on the following GeneBank accession numbers: V01217 (*β-Actin*: (Nudel et al., 1983)) and J05122 (*PTBR*: (Sprengel et al., 1989)). The forward and reverse primer sequences were as follows: 5'- CATCCCCCAAAGTTCTAC – 3' and 5'- CCAAAGCCTTCATACATC – 3' (*β-Actin*, 347bp); 5'- CCATGCTCAACTACTATGTATGGC – 3' and 5'- GTACAACTGTCCCCGCATG – 3' (*PTBR*, 234 bp). The specificity of the oligonucleotide primers was verified using the program BLASTN (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

[³H]PK11195 autoradiography

PTBR binding sites were determined by autoradiography using the specific PTBR / IBP ligand [³H]PK11195 as described before (Leong et al., 1996). 20 μM thick sagittal brain sections were cut using a cryostat and thaw-mounted on gelatin-coated microscope slides. Sections were allowed to dry and stored at –20 °C until use. Sections were then warmed up to room temperature and incubated for 60 min at in 170 mM Tris-HCl buffer (pH = 7.4, 25 °C) containing 1 nM [³H]PK11195 (specific activity 85.5 Ci/mmol; PerkinElmer, Boston, MA). Non-specific binding was determined on adjacent sections incubated in the same buffer in the presence of 1 mM unlabelled PK11195. Following the incubation period, sections were rinsed twice for 5 min in ice-cold buffer, dipped in ice-cold distilled water and dried rapidly under a stream of cold air. Dried sections and calibrated [³H] microscale standards (Amersham, NJ) were apposed to tritium sensitive Hyperfilm (Amersham) for 4 weeks at 4 °C. Films were developed and tissue concentrations of [³H]PK11195 were determined by quantitative densitometry analysis using an MCID computer-based densitometer and image-analysis system (Imaging

Research Inc., Canada). The amount of ligand bound to various brain regions was calculated from the specific activity of the ligand. Specific activity was calculated by subtracting the non-specific binding from the total binding of corresponding brain regions on adjacent tissue sections.

Brain pregnenolone content measurement

Cerebral cortex was dissected and homogenized in 2.5 mL hexane (Mallinckrodt Baker, NJ) together with an internal standard solution containing trace amounts of [^3H]pregnenolone for recovery determination. Samples were vortexed for 1 min and supernatant was removed after centrifugation (3000 rpm, 5 min). Extraction was then repeated with an additional 2.5 mL of hexane and the supernatants from both extractions were pooled. Samples were evaporated to dryness and resuspended in steroid diluent (ICN Biomedicals, CA). Pregnenolone content was measured using a radioimmunoassay kit according to the instructions supplied by the manufacturer (ICN Biomedicals).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences between groups were evaluated by the post-hoc Tukey Test. A p value <0.05 was considered to indicate a significant difference.

Results

Following hepatic devascularization, normothermic animals developed symptoms of encephalopathy progressing from lethargy to loss of righting ability (precoma stage) and loss of corneal reflex (coma stage). Hypothermia significantly slowed the onset of encephalopathy with the result that at the time normothermic rats were comatose, hypothermic animals had not started to show significant neurological deterioration. Rats sacrificed at coma stage of encephalopathy had significantly higher brain water content ($p < 0.01$) while paired rats kept mildly hypothermic had brain water content similar to that of sham-operated animals (Figure 1).

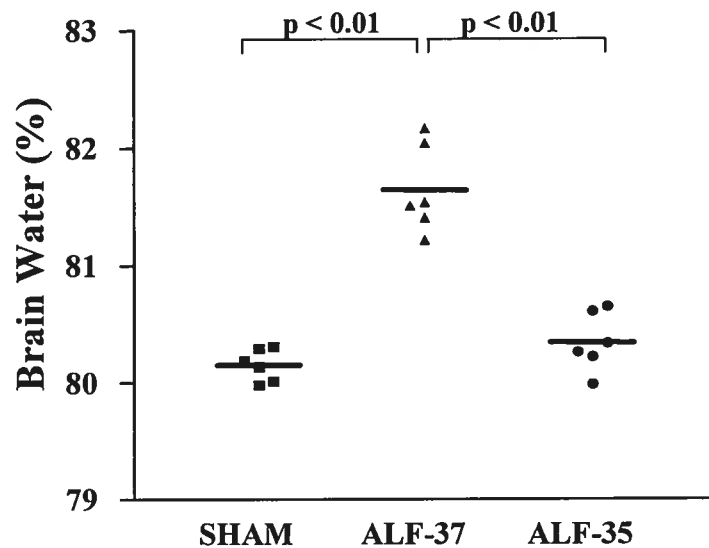


Figure 1. Brain water content in rats with ALF due to hepatic devascularization compared to sham-operated controls. Normothermic rats (ALF-37; ▲) had significantly higher brain water content compared to sham-operated controls (SHAM; ■) or hypothermic rats (ALF-35; ●). Data points represent individual animals and horizontal bars indicate mean values of $n = 6$ animals per experimental group. Significant differences between groups are indicated by respective p values.

RT-PCR analysis revealed a significant increase in the steady state level of *PTBR* mRNA following hepatic devascularization both in normothermic (113%, $p < 0.001$) and hypothermic (80%, $p < 0.001$) animals. However, mRNA levels were significantly lower ($p < 0.05$) in hypothermic compared to normothermic animals (Figure 2). This increase of *PTBR* gene expression was selective since mRNA level of glutamine synthetase, an astrocytic marker protein, was unchanged (data not shown).

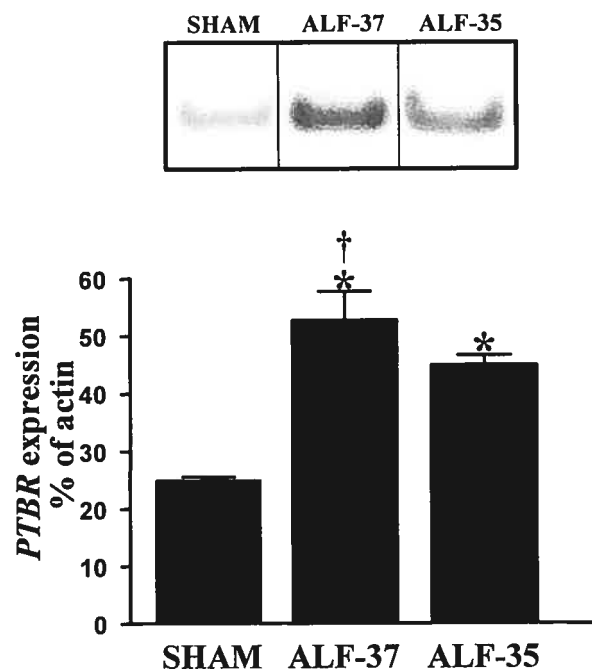


Figure 2. Increased expression of IBP in the cerebral cortex of rats with ALF due to hepatic devascularization. Total RNA was extracted from the frontal cortices of sham-operated rats and ALF rats maintained normothermic (ALF-37) or mildly hypothermic (ALF-35). β -actin (347bp) and IBP (234 bp) were reverse-transcribed and amplified by PCR for 18 and 30 cycles, respectively. Representative samples are shown. Values represent mean \pm SEM ($n=4$). * $p < 0.001$ compared to sham-operated group; \dagger $p < 0.05$ compared to ALF-35 group determined by ANOVA and post-hoc Newman-Keuls test.

Hepatic devascularization also resulted in a significant (42 %; $p < 0.05$) increase in [^3H]PK11195 binding sites in the cerebral cortex of rat with ALF and maintained mildly hypothermic (Figure 3). [^3H]PK11195 binding sites were further increased in ALF rats maintained normothermic (157 % compared to sham, $p < 0.001$; 81% compared to ALF-35, $p < 0.001$) (Figure 3). Brain pregnenolone levels were significantly elevated (2.1-fold compared to sham; $p < 0.05$) in the cerebral cortex of ALF rats maintained normothermic (Figure 4); mild hypothermia prevented the increase of brain pregnenolone (Figure 4).

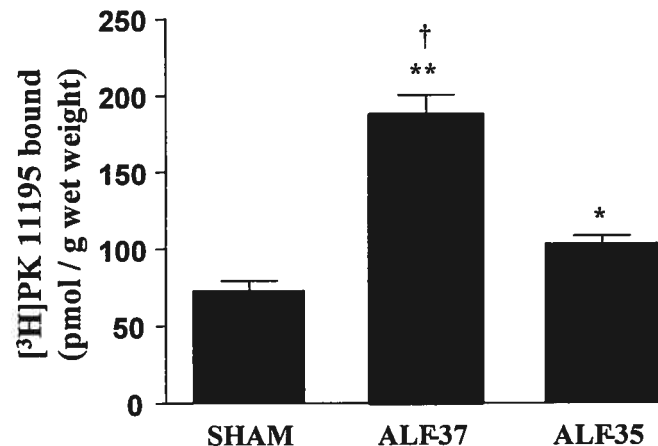


Figure 3. [^3H]PK11195 binding site densities in the cerebral cortices of ALF due to hepatic devascularization. ALF rats maintained normothermic (ALF-37; $n=5$) or mildly hypothermic (ALF-35; $n=6$) had higher [^3H]PK11195 binding site densities compared to sham-operated controls (SHAM; $n=6$). Values represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to shams; ** $p < 0.001$ compared to shams; † $p < 0.001$ compared to ALF-35.

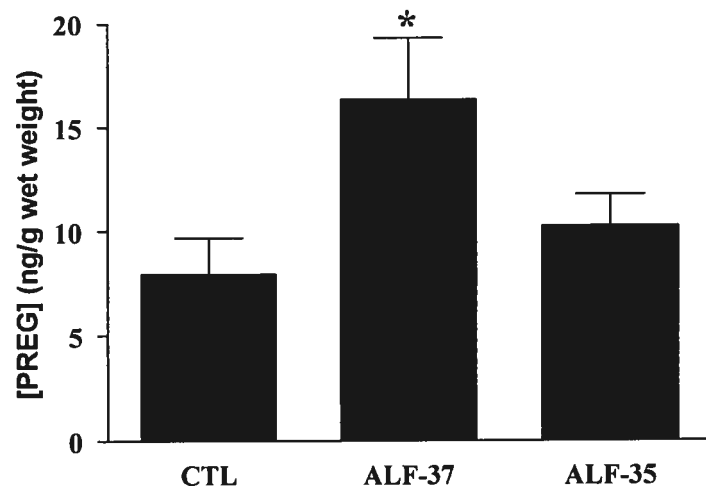


Figure 4. Pregnenolone concentration in the cerebral cortices of ALF rats due to hepatic devascularization. ALF rats maintained normothermic (ALF-37; n=5) had significantly higher pregnenolone levels compared to ALF rats maintained mildly hypothermic (ALF-35; n=6) or sham-operated controls (SHAM; n=6). Values represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to shams.

Discussion

Induction of PTBR expression in the brain is a consistent finding associated with both acute and chronic liver failure. Increased densities of binding sites for the PTBR ligand [^3H] PK11195 were reported in the brains of rats following portacaval anastomosis, an experimental model of chronic liver failure (Desjardins et al., 1999; Rao et al., 1994) as well as in the frontal cortex and caudate nuclei of cirrhotic patients who died in hepatic coma (Lavoie et al., 1990). The use of Positron Emission Tomography (PET) with [^{11}C]PK11195 as a ligand revealed that the increase in brain PTBR binding sites was

positively correlated with the degree of cognitive impairment in cirrhotic patients as assessed by psychometric testing (Cagnin et al., 2001). Furthermore, the increase of PTBR expression in the cerebral cortex of cirrhotic patients is correlated with the presence of Alzheimer type II astrocytosis, a characteristic neuropathological finding in patients with chronic liver disease, suggesting a possible role of PTBR in the occurrence of astrocytic changes associated in chronic HE (Bélangier et al., 2003). Experimental ALF induced by the administration of the hepatotoxin thioacetamide (TAA) to mice also resulted in increased brain PTBR binding sites (Itzhak et al., 1995; Kadota et al., 1996) as a result of increased levels of PTBR/ isoquinoline binding protein mRNA (Kadota et al., 1996).

The precise mechanisms responsible for the induction of PTBR in liver failure are not completely understood. However, a number of studies suggest that hyperammonemia, which is a common feature of chronic and acute liver failure, may be implicated. In support of this hypothesis, brains of mice administered ammonium acetate manifested an increased number of binding sites for [^3H] PK11195 and [^3H] Ro5-4864, two specific PTBR ligands (Itzhak et al., 1995). In addition, mice with chronic hyperammonemia due to congenital ornithine transcarbamylase deficiency (sparse fur (spf/Y) mice) also display increased brain [^3H] PK11195 binding site densities (Rao et al., 1993). Furthermore, exposure of cultured astrocytes to pathophysiological concentrations of ammonia for 24 h results in an increased number of [^3H] PK11195 binding sites (Itzhak et Norenberg, 1994).

Considering the various cellular functions attributed to PTBR, unravelling the precise consequences of an increased number of this receptor has proven challenging. However, the role of PTBR in steroidogenesis is arguably its most extensively studied function. PTBR mediates the transport of cholesterol from the outer to the inner

mitochondrial membrane where it is converted to pregnenolone by the action of the mitochondrial side chain cleavage enzyme (Papadopoulos et al., 1997; Li et Papadopoulos, 1998). Pregnenolone is the precursor molecule for the subsequent synthesis of neurosteroids, some of which have potent modulatory effects on excitatory and/or inhibitory neurotransmission (see (Mellon et Griffin, 2002) for review). Interestingly, the administration of the neurosteroids tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) and, more effectively, tetrahydroprogesterone (THP) to mice recapitulates many of the symptoms observed in HE (i.e. ataxia, loss of righting reflex, coma) (Norenberg et al., 1997). Results from the present study indicate that the induction of PTBR was accompanied by increased brain levels of the neurosteroid precursor pregnenolone in the cerebral cortex of rats at coma stage of encephalopathy (Figure 4). Similar increases of brain levels of pregnenolone have been reported in mice with ALF resulting from administration of TAA (Itzhak et al., 1995).

In vitro studies using cultured astrocytes demonstrate that the PTBR and neurosteroids influence ammonia-induced astrocytic swelling; it was demonstrated that the PTBR antagonist PK11195 attenuates ammonia-induced swelling whereas the PTBR agonist Ro5-4864 increases ammonia-induced swelling (Bender et Norenberg, 1998). In addition, various neurosteroids can either potentiate or inhibit ammonia-induced swelling, depending on the concentration used (Bender et Norenberg, 1998). Whether or not the reported increase of PTBR expression and the increased levels of neurosteroid precursor pregnenolone contributes to astrocytic swelling and brain edema *in vivo* during ALF awaits further studies. However, this view is supported by the results of the present study demonstrating that mild hypothermia prevented both the increase of PTBR expression,

pregnenolone content and the rise of brain water content observed in paired ALF animals kept normothermic. Studies in rats with hepatic devascularization have demonstrated a protective effect of mild hypothermia in this model of ALF (Traber et al., 1989; Rose et al., 2000; Chatauret et al., 2001; Chatauret et al., 2003). Beneficial effects of hypothermia in these animals include delay in the onset of encephalopathy, attenuation of the increase of CSF ammonia concentration, prevention of brain edema and improved brain glucose metabolism (Rose et al., 2000; Chatauret et al., 2003). Mild hypothermia has also proven to be a useful tool in the management of patients with ALF by effectively reducing intracranial pressure and improving cerebral perfusion pressure in patients awaiting orthotopic liver transplantation (Jalan et al., 1999). In the present study, we demonstrate that mild hypothermia attenuates the increase of both *PTBR* / *IBP* mRNA expression and [³H] PK11195 binding sites caused by hepatic devascularization. In addition, mild hypothermia prevented the increase of pregnenolone levels as well as brain water content observed in the brain of rats with ALF at coma stage of encephalopathy. In view of these findings, it is possible that mild hypothermia exerts some of its protective effects by preventing the synthesis of neurosteroids that contribute to brain edema. It is unclear if the attenuation of PTBR induction is a primary effect of mild hypothermia or is secondary to the decrease brain ammonia concentration previously reported in the same model (Rose et al., 2000). Further studies are needed to clarify this issue.

In conclusion, results of the present study demonstrate that mild hypothermia results in attenuation of PTBR induction and prevention of the increase of pregnenolone levels in rats with hepatic devascularization. A better understanding of the various mechanisms by which hypothermia exerts its protective effects is a valuable approach to further elucidate

the pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema occurring as a result of acute liver failure.

Acknowledgements

Studies were funded by the Canadian Institute for Health Research (CIHR). Mireille Bélanger is a recipient of the CIHR Doctoral Research Award.

References

- Alho, H., Varga, V., Krueger, K.E., 1994. Expression of mitochondrial benzodiazepine receptor and its putative endogenous ligand diazepam binding inhibitor in cultured primary astrocytes and C-6 cells: relation to cell growth. *Cell Growth Differ.* 5, 1005-1014.
- Anholt, R.R., Pedersen, P.L., De Souza, E.B., Snyder, S.H., 1986. The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 261, 576-583.
- Bélanger, M., Aboucha S., Desjardins P., Butterworth R.F. 2003. Upregulation of peripheral-type (mitochondrial) benzodiazepine receptors in hyperammonemic syndromes: consequences for neuronal excitability. In: Hertz, L. (Ed.) *Advances in Molecular and Cell Biology*. 31(3), pp. 983-998.
- Bender, A.S., Norenberg, M.D., 1998. Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammonia-induced swelling in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 54, 673-680.
- Cagnin, A., Taylor-Robinson, S.D., Forton, D.M., Banati, R.B., 2001. In vivo quantification of cerebral "peripheral benzodiazepine binding site" in minimal Hepatic Encephalopathy. *J. Hepatol.* 34, 58 [Abstract]
- Casellas, P., Galiegue, S., Basile, A.S., 2002. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int.* 40, 475-486.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Kroemer, G., 2002. Mitochondrial apoptosis and the peripheral benzodiazepine receptor: a novel target for viral and pharmacological manipulation. *J. Exp. Med.* 196, 1121-1125.

Chatauret, N., Rose, C., Therrien, G., Butterworth, R.F., 2001. Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure. *Metab Brain Dis.* 16, 95-102.

Chatauret, N., Zwingmann, C., Rose, C., Leibfritz, D., Butterworth, R.F., 2003. Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: a H/C-nuclear magnetic resonance study. *Gastroenterology* 125, 815-824.

Desjardins, P., Bandeira, P., Rao, V.L., Butterworth, R.F., 1999. Portacaval anastomosis causes selective alterations of peripheral-type benzodiazepine receptor expression in rat brain and peripheral tissues. *Neurochem. Int.* 35, 293-299.

Itzhak, Y., Norenberg, M.D., 1994. Ammonia-induced upregulation of peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes labeled with [3H]PK11195. *Neurosci. Lett.* 177, 35-38.

Itzhak, Y., Roig-Cantisano, A., Dombro, R.S., Norenberg, M.D., 1995. Acute liver failure and hyperammonemia increase peripheral-type benzodiazepine receptor binding and pregnenolone synthesis in mouse brain. *Brain Res.* 705, 345-348.

Jalan, R., Damink, S.W., Deutz, N.E., Lee, A., Hayes, P.C., 1999. Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* 354, 1164-1168.

Jones, E.A., 2002. Ammonia, the GABA neurotransmitter system, and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 17, 275-281.

Kadota, Y., Inoue, K., Tokunaga, R., Taketani, S., 1996. Induction of peripheral-type benzodiazepine receptors in mouse brain following thioacetamide-induced acute liver failure. *Life Sci.* 58, 953-959.

Lavoie, J., Layrargues, G.P., Butterworth, R.F., 1990. Increased densities of peripheral-type benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology* 11, 874-878.

Lee, S.H., Fisher, B., 1961. Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 50, 668-672.

Leong, D.K., Oliva, L., Butterworth, R.F., 1996. Quantitative autoradiography using selective radioligands for central and peripheral-type benzodiazepine receptors in experimental Wernicke's encephalopathy: implications for positron emission tomography imaging. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 20, 601-605.

Li, H., Papadopoulos, V., 1998. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology* 139, 4991-4997.

Marmarou, A., Poll, W., Shulman, K., Bhagavan, H., 1978. A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J. Neurosurg.* 49, 530-537.

McEnery, M.W., Snowman, A.M., Trifiletti, R.R., Snyder, S.H., 1992. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 3170-3174.

Mellon, S.H., Griffin, L.D., 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab* 13, 35-43.

Norenberg, M.D., Itzhak, Y., Bender, A.S., 1997. The peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in hepatic encephalopathy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 420, 95-111.

Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S., Levy, Z., Yaffe, D., 1983. The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res.* 11, 1759-1771.

Papadopoulos, V., Amri, H., Boujrad, N., Cascio, C., Culty, M., Garnier, M., Hardwick, M., Li, H., Vidic, B., Brown, A.S., Reversa, J.L., Bernassau, J.M., Drieu, K., 1997. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* 62, 21-28.

Rao, V.L., Audet, R., Therrien, G., Butterworth, R.F., 1994. Tissue-specific alterations of binding sites for peripheral-type benzodiazepine receptor ligand [3H]PK11195 in rats following portacaval anastomosis. *Dig. Dis. Sci.* 39, 1055-1063.

Rao, V.L., Qureshi, I.A., Butterworth, R.F., 1993. Increased densities of binding sites for the peripheral-type benzodiazepine receptor ligand [3H]PK11195 in congenital ornithine transcarbamylase-deficient sparse fur mouse. *Pediatr. Res.* 34, 777-780.

Rose, C., Michalak, A., Pannunzio, M., Chatauret, N., Rambaldi, A., Butterworth, R.F., 2000. Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology* 31, 872-877.

Sprengel, R., Werner, P., Seeburg, P.H., Mukhin, A.G., Santi, M.R., Grayson, D.R., Guidotti, A., Krueger, K.E., 1989. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a peripheral-type benzodiazepine receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 20415-20421.

Taketani, S., Kohno, H., Furukawa, T., Tokunaga, R., 1995. Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. *J. Biochem. (Tokyo)* 117, 875-880.

Traber, P., DalCanto, M., Ganger, D., Blei, A.T., 1989. Effect of body temperature on brain edema and encephalopathy in the rat after hepatic devascularization. *Gastroenterology* 96, 885-891.

Woods, M.J., Williams, D.C., 1996. Multiple forms and locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Biochem. Pharmacol.* 52, 1805-1814.

Article 3:

***Selectively increased expression of the astrocytic/endothelial glucose transporter protein
GLUT1 in acute liver failure***

Glia (2006), 53(5): 557-62.

Mireille Bélanger, Paul Desjardins, Nicolas Chatauret and Roger F. Butterworth

Unité de Recherche en sciences neurologiques, Hôpital Saint-Luc (CHUM), Montréal,

Québec, Canada, H2X 3J4

Abstract

Acute liver failure is consistently accompanied by alterations in brain energy metabolites and recent studies using Nuclear Magnetic Resonance suggest disturbances in brain oxidative metabolism in experimental acute liver failure. Glucose transport across the blood-brain barrier is essential to sustain brain energy metabolism and is accomplished by the facilitative glucose transporter GLUT1. To further investigate alterations in brain glucose uptake in acute liver failure, GLUT1 expression and [^{14}C]2-deoxy-D-glucose uptake were measured in the brains of rats with hepatic devascularization. RT-PCR and Western blot analyses showed significant increases in steady-state levels of GLUT1 mRNA and protein in frontal cortex as early as 6 hours following hepatic devascularization, (prior to the onset of brain edema and encephalopathy) which remained elevated at coma stages of encephalopathy. Expression of both the astrocytic (45 kDa) and endothelial (55 kDa) forms of GLUT1 was increased as a result of hepatic devascularization. Exposure of cultured astrocytes to pathophysiologically relevant concentrations of ammonia resulted in increased GLUT1 expression, suggesting that elevated ammonia levels are responsible for GLUT1 up-regulation in acute liver failure. Increased GLUT1 expression in acute liver failure was selective as the expression of the neuronal glucose transporter GLUT3 and other glucose-regulated proteins (GRP-78 and GRP-94) was unaltered. [^{14}C]2-deoxy-D-glucose autoradiography revealed increases in cerebral glucose uptake concomitant with induction of GLUT1 in acute liver failure. These results suggest that ammonia-induced increases of GLUT1 expression resulting in increased cerebral glucose uptake are implicated in the pathogenesis of the neurological complications of acute liver failure.

Introduction

Acute liver failure (ALF) is a serious condition that may result in severe neurological complications such as hepatic encephalopathy and brain edema leading to intracranial hypertension, brain herniation and death. Recent spectroscopic studies in experimental ALF reveal that alterations of brain oxidative glucose metabolism and increased lactate synthesis may be implicated in the pathogenesis of the cerebral complications of ALF (Chatauret et al., 2003; Zwingmann et al., 2003). Further supporting a role of impaired brain energy metabolism in ALF, elevations of brain lactate concentrations correlating with the degree of neurological impairment are consistently reported in experimental models of ALF (Chatauret et al., 2001; Mans et al., 1994; Nyberg et al., 1998; Zwingmann et al., 2003). In addition, studies using cerebral microdialysis in patients with ALF reveal that surges of intracranial hypertension are preceded by elevations of extracellular lactate concentrations (Tofteng et al., 2002).

Despite its elevated metabolic demands, the brain has very little energy reserves and relies to a large extent on blood-borne glucose as its prime energy substrate. Glucose transport across biological membranes is mediated by a family of facilitative, sodium-independent, glucose transporters. In the central nervous system (CNS), glucose transport across the blood-brain barrier (BBB) is mediated by the transporter GLUT1 (55 kDa) which is highly expressed by endothelial cells (Maher et al., 1994). A second form of GLUT1 (45 kDa) differing from the 55 kDa form by the degree of glycosylation is expressed in the cerebral parenchyma by astrocyte cell bodies and processes as well as in astrocytic end feet surrounding blood capillaries (Leino et al., 1997). Other isoforms of the glucose transporter

family are expressed in the CNS in addition to GLUT1 the most important ones being GLUT3 in neurons (Leino et al., 1997) and GLUT5 in microglia (Payne et al., 1997)

The present study evaluated the expression of GLUT1 at the mRNA and protein levels in frontal cortex of rats with ALF resulting from hepatic devascularization. Brain glucose uptake was evaluated in parallel in order to assess the functional consequences of alterations of GLUT1 expression. Furthermore, given the key role of ammonia in the pathogenesis of encephalopathy and brain edema in ALF (Butterworth, 2002), the effects of ammonia exposure on glucose transporter expression and function were investigated in primary cultures of rat cortical astrocytes.

Materials and Methods

Animal surgery

Male Sprague-Dawley rats (175-200 g) were anesthetized with halothane, and an end-to-side portacaval anastomosis was performed according to the guidelines of Lee and Fisher (1961). Rats underwent a laparotomy, the inferior vena cava and portal vein were isolated and clamped using an anastomosis clamp (Roboz Instruments Inc, Washington D.C.) and an elliptical portion of the vein 1.5 times the diameter of the portal vein was removed. The portal vein was ligated and cut, and an end-to-side anastomosis was performed under a dissecting microscope. Total surgery time was <15 min. Sham-operated control rats, matched for weight, were similarly anesthetized and the inferior vena cava was clamped for 15 min. Following surgery all animals were individually housed with free access to food and water under constant conditions of temperature, humidity, and light cycles. Twenty-four hours after portacaval anastomosis, rats were reanesthetized, subjected

to hepatic artery ligation (HAL) and either sacrificed 6 h after HAL or allowed to proceed to coma stage of encephalopathy (loss of corneal reflex). Rats were sacrificed by decapitation. Brains were rapidly removed, dissected on ice and were immediately frozen in isopentane. All tissues were stored at -70°C until use. All the above surgical methods were conducted in accordance with the Guidelines of Canadian Council of Animal care and were approved by the Animal Research Committee at Saint-Luc Hospital (C.H.U.M.).

Western blot analysis

Protein extracts were prepared as described by Nagamatsu et al. (1992). Briefly, frontal cortex was dissected and homogenized in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 250 μM sucrose and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Homogenates were centrifuged at 900 g for 10 min at 4°C and resulting supernatant was centrifuged at 110 000 g for 45 min at 4°C . Pellets were solubilized in 250 μL 10 mM Tris-HCl containing 0.5 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate and protease inhibitor mixture for 1 h at 4°C . The insoluble fraction was removed following centrifugation at 13 000 g for 30 min and protein samples of equal concentration were boiled for 5 min in loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol; 2% sodium dodecyl sulfate, 0.1 M dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue). Proteins (50 μg) were resolved by 8% denaturing SDS-polyacrylamide gels and transferred overnight to PVDF membranes. The membranes were blocked for 1 h in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% dry milk and 0.1% Tween 20, then incubated for 1 h with a rabbit polyclonal antibody (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) directed against GLUT1 (Santa Cruz Biotechnology, CA) or a monoclonal antibody (1/100 000 dilution) directed against β -actin (Sigma). The blots were subsequently probed with anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antiserum (PerkinElmer, Boston, MA)

diluted 1/12 000 in the same buffer. After extensive washing with TBS containing 0.1 % Tween 20, the peroxidase activity was visualized by an enhanced chemiluminescence detection system (PerkinElmer).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded sections (6 μ m) were prepared from formalin-fixed brains. The sections were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with 0.3% H₂O₂ for 10 min to inactivate endogenous peroxidase. Non specific sites were blocked in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 5 % heat-inactivated donkey serum for 1 h. Sections were incubated 1 h with rabbit anti-GLUT1 polyclonal antibody (1/5000 dilution; Chemicon International, Temecula, CA). Sections were then washed and incubated with biotinylated donkey anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) at a 1:250 dilution for 1 h at room temperature. Sections were washed with PBS and incubated with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain, Vector laboratories, Burlingame, CA) for 30 min. Immunostaining was visualized using 3,3'-diaminobenzidine-(HCl) (0.5mg/ml) containing 0.01% hydrogen peroxide and sections were counterstained using cresyl violet. Control sections incubated with PBS instead of primary antibody showed absence of immunostaining.

RNA extraction

Total RNA was extracted using TRIZOL Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. Putative contaminating DNA was eliminated by adding 100 U of RNase-free DNase I per 50 μ g of total RNA at 37°C for 1 h. Purified

RNA was then extracted with phenol, precipitated with ethanol and resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water. RNA samples were kept at -70°C until use.

RT-PCR analysis

β -actin was used as an internal standard to monitor loading variations. Total RNA (1 μ g) was mixed with 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.01%(w/v) bovine serum albumin, 100 μ M dNTPs, primers at 1 μ M each, AMV reverse transcriptase (80 U/ml), *Taq* DNA polymerase (20 U/ml) and 50 μ Ci/ml [α^{32} P]dCTP (3000 Ci/mmol), for a total reaction volume of 50 μ l. The reactions were initially heated at 50°C for 15 min followed by PCR at 95°C for 30 sec, 60°C for 45 sec and 72°C for 1 min. Amplification efficiency conditions were determined by a kinetic study, to ensure all experiments were performed within the exponential phase of amplification where PCR product remains proportional to initial template concentration (data not shown). *β -Actin*, *GLUT1*, *GLUT3*, *GRP-78* and *GRP-94* were amplified for 18, 25, 27, 23 and 23 cycles respectively. After amplification, the samples were electrophoresed onto 9% polyacrylamide gels, dried, autoradiographed at -70°C with an intensifying screen. Each band was excised and Cerenkov radiation was quantitated using a β -counter. Oligonucleotide primers were designed using the PRIME program (Genetic Computer Group, Wisconsin) and synthesized by the Sheldon Biotechnology Center (McGill University, Quebec). The forward and reverse primer sequences used as well as the corresponding GeneBank accession numbers are listed in Table 1. The specificity of the oligonucleotide primers was verified using the program BLASTN (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

Gene	Sense primer	Product (bp)	Accession	Reference
	Antisense primer			
GLUT1	5' – CCCGCTTCCTGCTCATCAA – 3' 5' – GACCTTCTTCTCCCGCATCATC – 3'	140	M13979	(Birnbaum et al., 1986)
GLUT3	5' – AACCAGCTGGGCATCGTTG – 3' 5' – CACAACCGCTGGAGGATCT – 3'	218	U17978	(Krishnan and Haddad, 1995)
GRP-78	5' – AGTGGTGGCCACTAATGGAG – 3' 5' – CTTCAAATTTGGCCCGAGTA – 3'	257	M14050	(Munro and Pelham, 1986)
GRP-94	5' – CGAAAAGGACTTGCGACTCT – 3' 5' – CTTCATCGTCTGTCCGTGAG – 3'	175	S69315	(De Vouge et al., 1994)
β -actin	5' – CATCCCCCAAAGTTCTAC – 3' 5' – CCAAAGCCTTCATACATC – 3'	347	V01217	(Nudel et al., 1983)

[¹⁴C]2-deoxy-D-glucose autoradiography

A separate set of rats was used for this study. 50 μ Ci/Kg [¹⁴C]2-deoxy-D-glucose (2DG; specific activity, 49 mCi/mmol; Perkin Elmer) was administered via a catheter installed in the vena cava at the time of ligation of the hepatic artery. The catheter was immediately flushed with 500 μ L of saline. Rats were killed by decapitation 45 min later and brains were rapidly removed, frozen in isopentane and stored at –70°C until use. 20 μ M thick sagittal sections were cut using a cryostat, thaw-mounted on gelatin-coated slides and dried on a hotplate at 50°C. Sections were exposed to Hyperfilm MP autoradiography film (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) for 15 days. Optical density was measured in different brain regions using an MCID-M1 imaging system (Imaging Research Inc., ON,

Canada) and values were converted to nmol/g using co-exposed [^{14}C] microscale standards (Amersham).

Cell Culture

Rat primary cortical astrocyte cultures were prepared according to the method described by Booher and Sensenbrenner (1972). Briefly, cerebral cortices from 1 day old Sprague-Dawley pups (Charles River, QC) were removed, dissected free of meninges and mechanically dissociated. Debris were removed by successive filtering with 80 μM and 10 μM sterile nylon mesh and cell suspension was plated in 35 mm dishes. Cultures were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma-Aldrich) containing 10 % calf serum (Invitrogen) in an atmosphere containing 5 % CO_2 until they reached confluency. Cultures were then maintained in DMEM containing 10% horse serum (Invitrogen). Cells were grown for a total of 3-4 weeks, during which time culture medium was changed twice a week.

[^3H]2-deoxyglucose uptake

Cultures were exposed to 5 mM ammonium chloride in 10% horse serum-containing DMEM for 24 hrs. In vitro [^3H]2-deoxyglucose uptake was performed as previously described (Voutsinos-Porche et al., 2003). On the day of the experiment, cells were incubated in low glucose, serum-free DMEM (Sigma-Aldrich) for 2 h after which time medium was replaced by the same DMEM containing 1 mCi/mL [^3H]-2-deoxyglucose (PerkinElmer) for a reaction time of 20 min. The reaction was stopped by three quick washes with ice-cold phosphate-buffered saline. Cells were scraped in 500 μL of a solution

of 0.01 N NaOH containing 0.1% Triton X-100 and 350 μ L was used to determine radioactivity counts while 25 μ L was used to measure protein concentration. Cytochalasin B (25 μ M; Sigma-Aldrich) was added to separate groups of plates 20 min prior to and during the incubation and values were subtracted from total counts in order to determine the amount of glucose-transporter mediated uptake. Ammonia treatment was maintained throughout the uptake experiment in appropriate groups.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Comparison of values was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences between groups were evaluated by the post-hoc Tukey Test. A p value < 0.05 was considered to indicate a significant difference.

Results

RT-PCR analyses revealed a significant increase (25 %, $p < 0.05$) in GLUT1 mRNA expression in rat frontal cortex as early as 6 h following hepatic devascularization. Similar increases of GLUT1 mRNA levels were maintained at coma stages of encephalopathy (28 %, $p < 0.05$) (Figure 1a). This increase of GLUT1 mRNA expression was selective since mRNA levels of the neuronal glutamate transporter GLUT3 were unchanged (Figure 1b). Furthermore, brain mRNA levels of two major glucose-regulated proteins (GRP-78 and GRP 94) were likewise unchanged (Figure 2).

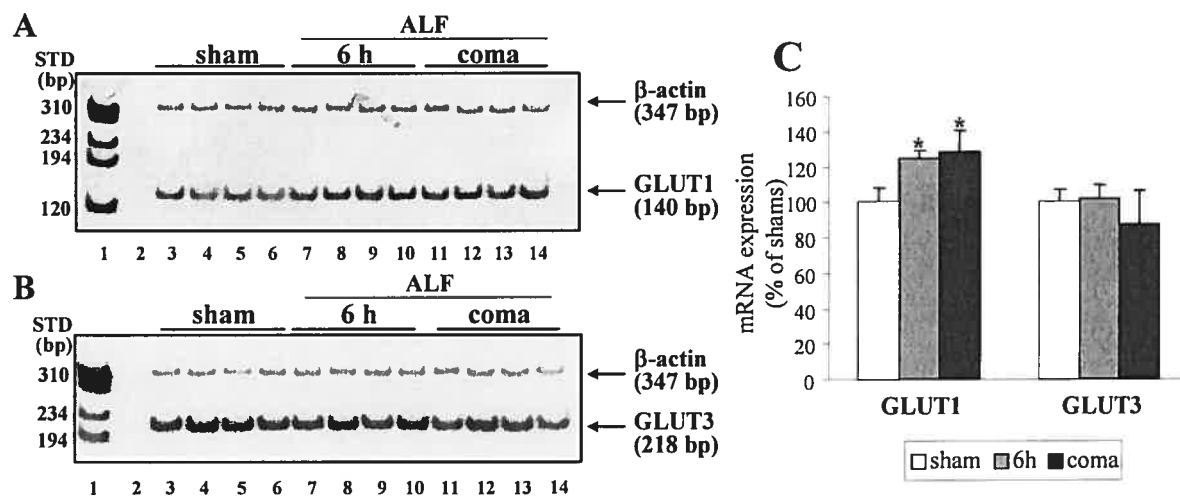


Figure 1. (A) Increased expression of glucose transporter (GLUT1) mRNA in the brains of rats with acute liver failure. (B) mRNA expression of the neuronal glucose transporter (GLUT3) was unchanged. Total RNA was extracted from the frontal cortices of rats with acute liver failure 6 h following hepatic artery ligation (lanes 7-10), at coma stages of encephalopathy (lanes 11-14) or from sham-operated controls (lanes 3-6). Lane 1: molecular weight standards (bp); lane 2: AMV reverse transcriptase was omitted from the reaction mixture as a negative control. β -actin was used as reporter gene to normalize for loading variations. C) Schematic representation of the data shown in panel A and B. * $p < 0.05$ versus sham-operated controls.

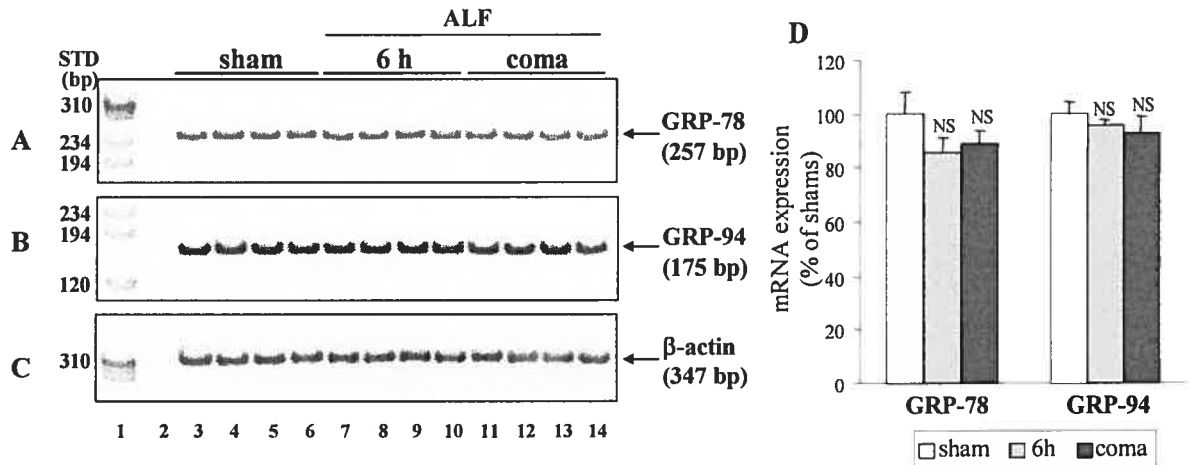


Figure 2. mRNA expression of the glucose-regulated proteins (GRP) 78 (panel A) and 94 (panel B) in the brains of rats with acute liver failure. Total RNA was extracted from the frontal cortices of rats with acute liver failure 6 h following hepatic artery ligation (lanes 7-10), at coma stages of encephalopathy (lanes 11-14) or from sham-operated controls (lanes 3-6). Lane 1: molecular weight standards (bp); lane 2: AMV reverse transcriptase was omitted from the reaction mixture as a negative control. β -actin (panel C) was used as reporter gene to normalize for loading variations. C) Schematic representation of the data shown in panels A-D. NS: not significantly different from sham-operated animals.

Western blot analyses revealed increased expression of both forms of GLUT1 protein occurring 6 h following hepatic devascularization and maintained until coma stages of encephalopathy (Figure 3). The endothelial 55 kDa form was increased 133 % ($p < 0.01$) at 6 h and 128 % ($p < 0.01$) at coma stages of encephalopathy compared to sham-operated animals. Levels of the 45 kDa (astrocytic) form were increased 25 % ($p < 0.05$) and 20 % ($p < 0.05$) at 6 h and coma, respectively. Immunohistochemical studies using a specific antibody against GLUT1 confirmed the increase of GLUT1 immunoreactivity in

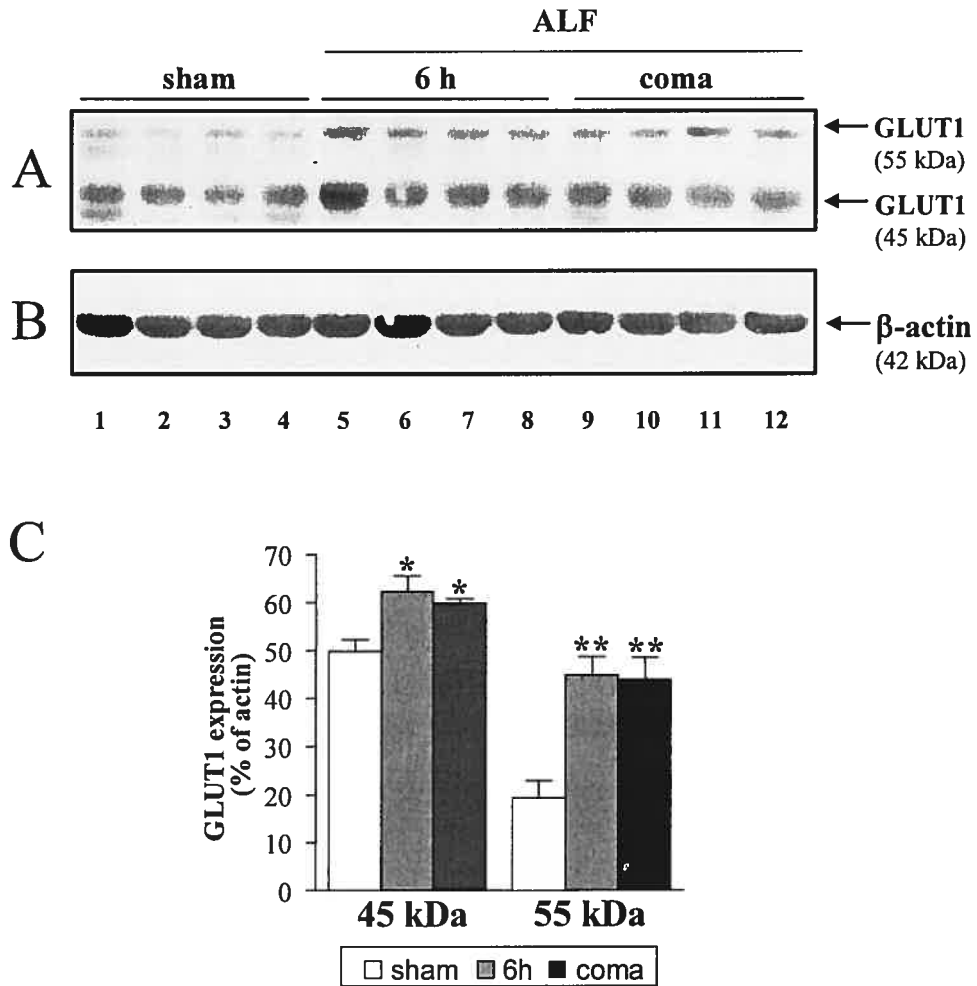


Figure 3. Increased protein expression of the 45 kDa and 55 kDa forms of GLUT1 in the brains of rats with acute liver failure. Protein extracts prepared from frontal cortices of rats sacrificed 6 h after hepatic artery ligation (lanes 5-9), at coma stage of encephalopathy (lanes 9-12) or from sham-operated controls (lanes 1-4) were separated by SDS-PAGE and probed using a polyclonal antibody against GLUT1 (A) or β -actin (B). (C) Schematic representation of the data shown in panel A and B (results are expressed as percentage of β -actin). * $p < 0.05$ versus sham-operated controls; ** $p < 0.01$ versus sham-operated controls.

endothelial cells in the cerebral cortex of rats at coma stages of encephalopathy (Figure 4). Immunohistochemical staining specific for collagen type IV did not reveal any significant change in blood capillary density in the cortex of ALF rats compared to sham-operated controls (data not shown).

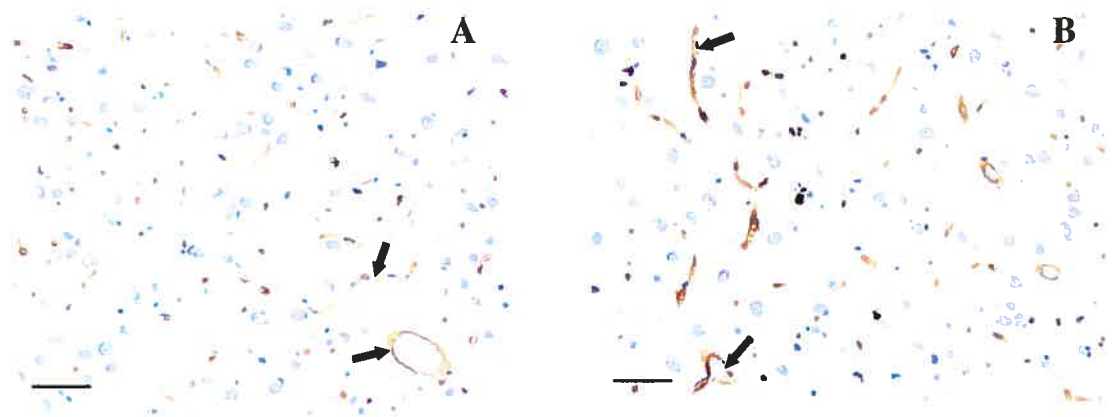


Figure 4. Representative immunohistochemical staining of GLUT1 in the frontal cortex of a sham-operated rat (A) compared to a rat with ischemic liver failure at coma stage of encephalopathy (B). Perivascular GLUT1 immunostaining is indicated by arrows. Sections were counterstained with cresyl violet. Scale bar: 50 μ M.

[14 C]2-deoxy-D-glucose autoradiography revealed significant increases in glucose uptake in all brain regions studied in rats at coma stages of encephalopathy whereas brain [14 C]2-deoxy-D-glucose levels in animals sacrificed 6h following hepatic devascularization were similar to those observed in sham-operated controls (Table 2).

Table 2. Effects of Acute Liver Failure on brain [^{14}C]2-deoxy-D-glucose uptake

Brain Region	Sham (n=5)	ALF	
		6 h (n=4)	Coma (n=4)
Frontal cortex	2.38 \pm 0.07	2.06 \pm 0.36	3.74 \pm 0.33 * [†]
Cerebellum	1.67 \pm 0.08	1.75 \pm 0.35	3.55 \pm 0.41 ** [‡]
Pons	1.28 \pm 0.06	1.37 \pm 0.32	2.40 \pm 0.26 * [†]
Hippocampus	1.55 \pm 0.08	1.80 \pm 0.28	3.56 \pm 0.21 ** [‡]
Thalamus	2.12 \pm 0.11	2.24 \pm 0.38	3.48 \pm 0.19 * [†]
Striatum	1.68 \pm 0.12	2.21 \pm 0.33	4.04 \pm 0.40 ** [‡]

Values represent mean \pm SEM and are expressed in nmol 2-deoxy-D glucose /g tissue.

* p<0.05 vs Sham

** p<0.01 vs Sham

[†] p<0.05 vs 6 h

[‡] p<0.01 vs 6 h

Exposure of cultured astrocytes to 5 mM ammonium chloride for 24 h resulted in a significant 53% ($p < 0.05$) increase of GLUT1 expression as determined by Western blotting (Figure 5). Ammonia exposure also resulted in an increase of [^3H]-2-deoxyglucose uptake in primary cultures of astrocytes (Figure 5).

Discussion

Under normal physiological conditions, the brain relies primarily upon continuous glucose supply to meet its energy requirements. The facilitative glucose transporter protein GLUT1 is highly expressed by brain endothelial cells where it mediates glucose transport across the blood-brain barrier (BBB) (Maher et al., 1994). Studies carried out in normal adult rat brain reveal that regional GLUT1 expression correlates with local cerebral glucose utilization (LCGU) (Zeller et al., 1997) as well as with local glucose transport rates as determined using the non-metabolizable analogue 3-O- ^{14}C methylglucose

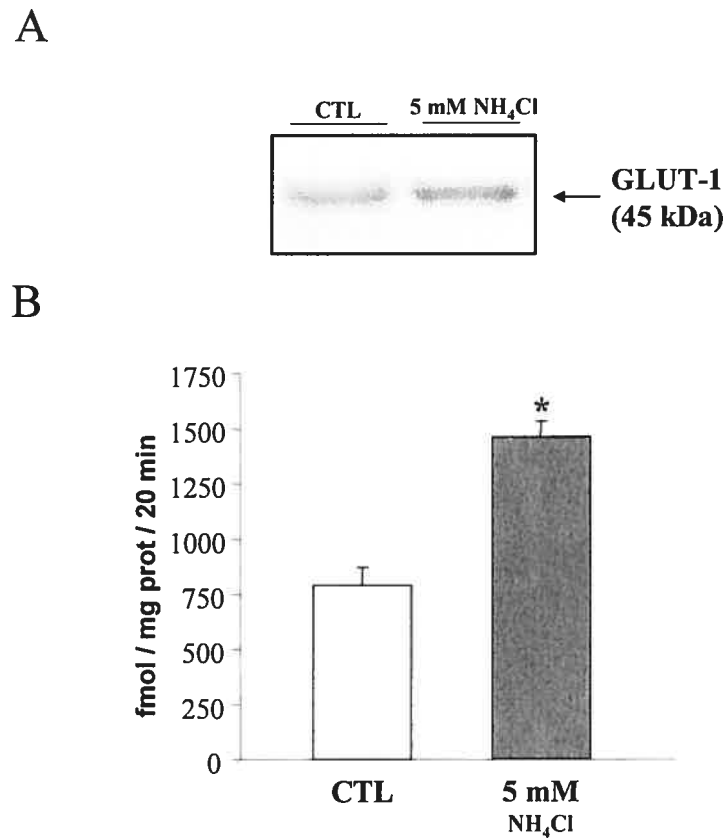


Figure 5. (A) Increased expression of GLUT-1 (45 kDa) in primary cultured astrocytes exposed to 5 mM NH₄Cl for 24 h. Protein extracts were separated by SDS-PAGE and probed using a polyclonal antibody against GLUT1. Representative bands are shown (n=6) (B) Increased [³H]2-deoxyglucose uptake in cultured astrocytes exposed to 5 mM NH₄Cl for 24 h. Data represent mean values ± SEM from n=5 plates per group. * p < 0.001 compared to controls by Student t test.

(Duelli et al., 2001). Not surprisingly, GLUT1 expression is modulated by a number of factors in order to adjust to variations in glucose availability and requirements. For example, *in vitro* studies show that GLUT1 expression is enhanced in conditions of glucose deprivation (Boado and Pardridge, 1993), hypoxia (Loike et al., 1992) or inhibition of oxidative metabolism (Shetty et al., 1992). Chronic hypoglycemia induced by continuous infusion of insulin in normal rats results in increased GLUT1 mRNA and protein expression at the BBB (Kumagai et al., 1995) whereas streptozocin-induced hyperglycemia induces a down-regulation of GLUT1 expression in rat brain microvessels (Pardridge et al., 1990).

In the present study, we demonstrate that ALF induced by hepatic devascularization results in early increases of expression of both the 45 kDa and 55 kDa forms of GLUT1 corresponding respectively to the astrocytic and endothelial forms of the transporter. Increased GLUT1 expression observed in this model could not be attributed to hypoglycemia resulting from acute liver failure since glycemia was maintained at normal levels throughout the experiments. Furthermore, previous studies indicate that increased brain GLUT1 expression occurs only after chronic hypoglycemia (> 5 days) (Kumagai et al., 1995); a timespan far exceeding that of the present study. Moreover, changes in GLUT1 expression could not be attributed to capillary recruitment since no change in the basal lamina protein collagen type IV was detected by immunohistochemistry.

Increased GLUT1 expression in brain in ALF was accompanied by a significant increase of [^{14}C]2-deoxy-D-glucose brain uptake at coma stages of encephalopathy. These findings add to a growing body of evidence to suggest that alterations in brain energy metabolism contribute to the cerebral complications of ALF. Previous studies in patients

with ALF reveal alterations of cerebral metabolic rate for glucose (CMR_{gluc}) (Jalan et al., 1999). In addition, increased extracellular brain levels of lactate have been reported in patients with ALF (Tofteng et al., 2002; Tofteng and Larsen, 2002).

Studies using ^{31}P NMR spectroscopy in animal models of ALF reveal that rats with ALF manifest unchanged brain concentrations of ATP and phosphocreatine (PCr) (Bates et al., 1989; Deutz et al., 1988). On the other hand, a recent study using ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy revealed an increase in *de novo* synthesis of lactate from $[1-^{13}\text{C}]\text{glucose}$ in the brain of rats with ALF due to hepatic devascularization that was correlated with the severity of encephalopathy. Furthermore, this study demonstrated decreased ^{13}C -label incorporation into $[4-^{13}\text{C}]\text{glutamate}$ (via pyruvate dehydrogenase) at coma stages of encephalopathy, indicating an inhibition of glucose oxidative metabolism in the brains of these animals (Zwingmann et al., 2003). These findings suggest that impaired TCA cycle flux in ALF rats results in a concomitant increase of cerebral glycolysis as a compensatory mechanism aimed at maintaining normal brain energy status. In accordance with this hypothesis, a number of studies have reported increased brain lactate concentrations in a wide variety of animal models of ALF (Bates et al., 1989; Bosman et al., 1990; Nyberg et al., 1998; Peeling et al., 1993; Therrien et al., 1991). Increased GLUT1 expression observed in the present study could facilitate the transport of increased amounts of glucose into the brain in an attempt to support higher glycolysis rates and maintain brain ATP levels. The precise mechanisms responsible for decreased TCA cycle flux in ALF are not fully understood. However, previous studies have demonstrated an inhibitory effect of ammonia on the TCA cycle enzymes α -ketoglutarate dehydrogenase (Lai and Cooper, 1986) and isocitrate

dehydrogenase (Katunuma et al., 1966), suggesting a possible role of ammonia in the disturbances of brain energy metabolism observed in experimental ALF.

It is interesting to note that the induction of GLUT1 reported in the present study occurs before any significant change of glucose transport is detectable in the brains of rats with ALF. The exact mechanism by which GLUT1 expression is induced is unclear, but it is possible that an unknown factor (possibly ammonia) causes an early up-regulation of GLUT1, which then leads to increase glucose transport into the brain at later stages of encephalopathy when the metabolic abnormalities associated with ALF are maximal.

Results of the present study reveal that exposure of primary cultures of astrocytes to pathophysiologically relevant (low millimolar) concentrations of ammonia results in increased GLUT1 expression and enhanced [^3H]-2-deoxyglucose uptake supporting a pathophysiological role of ammonia in the increase of GLUT1 expression and glucose uptake observed in this model of ALF. Further support for this mechanism is provided by the results of previous studies demonstrating increased brain glucose utilization in rats made hyperammonemic by acute administration of ammonium acetate (Hawkins et al., 1973). Increased glucose metabolic rates were also described in the brains of rats after intracarotid infusion of ammonium salts (Lockwood et al., 1986).

It has been proposed that GLUT1 belongs to the family of glucose-regulated proteins (GRPs), whose expression is induced by various cellular stresses such as glucose deprivation, disturbance of calcium stores, inhibition of glycosylation and reductive stress (Lee, 2001). Indeed, Wertheimer et al (1991) demonstrated that GLUT1 mRNA expression follows patterns induction similar to those of GRP-78, a well known stress-induced protein, following various cellular stresses *in vitro*. We therefore measured mRNA expression of two major GRPs (GRP-78 and GRP-94) in the cerebral cortex of rats at coma stage of

encephalopathy using the technique of RT-PCR. No significant changes of expression of either GRP-78 or GRP-94 was observed, suggesting that the up-regulation of GLUT1 is not related to glucose deprivation or other cellular stressors capable of inducing the expression of members of the GRP family (Figure 2).

Interestingly, overexpression of facilitative glucose transporters (of which GLUT1 is a member) in *Xenopus laevis* oocytes results in a 4.8-fold increase of the osmotic water permeability of these cells, even in the absence of glucose in the incubation media (Fischbarg et al., 1990). Furthermore, inhibitors of glucose transport decrease the osmotic water permeability in murine J774 cells (Fischbarg et al., 1989). These studies suggest that members of the facilitative glucose transporter family (of which GLUT1 is an example) may act as water channels. It is therefore conceivable that the increased expression of both the astrocytic and endothelial forms of GLUT1 in the brains of ALF rats may contribute to the brain edema consistently observed in these animals. Such a mechanism would be consistent with electron microscopic studies demonstrating swelling of both astrocytes and brain capillary endothelial cells in autopsied brain tissue from patients with ALF (Kato et al., 1992).

Acknowledgments

Studies were funded by the Canadian Institute for Health Research (CIHR). Mireille Bélanger is a recipient of the CIHR Doctoral Research Award.

References

- Bates TE, Williams SR, Kauppinen RA, Gadian DG. 1989. Observation of cerebral metabolites in an animal model of acute liver failure in vivo: a ^1H and ^{31}P nuclear magnetic resonance study. *J Neurochem* 53(1):102-110.
- Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM. 1986. Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(16):5784-5788.
- Boado RJ, Pardridge WM. 1993. Glucose deprivation causes posttranscriptional enhancement of brain capillary endothelial glucose transporter gene expression via GLUT1 mRNA stabilization. *J Neurochem* 60(6):2290-2296.
- Booher J, Sensenbrenner M. 1972. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 2(3):97-105.
- Bosman DK, Deutz NE, de Graaf AA, vd Hulst RW, van Eijk HM, Bovee WM et al. 1990. Changes in brain metabolism during hyperammonemia and acute liver failure: results of a comparative ^1H -NMR spectroscopy and biochemical investigation. *Hepatology* 12(2):281-290.
- Butterworth RF. 2002. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis* 17(4):221-227.
- Chatauret N, Rose C, Therrien G, Butterworth RF. 2001. Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 16(1-2):95-102.
- Chatauret N, Zwingmann C, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF. 2003. Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: a $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance study. *Gastroenterology* 125(3):815-824.

- De Vouge MW, Yamazaki A, Bennett SA, Chen JH, Shwed PS, Couture C et al. 1994. Immunoselection of GRP94/endoplasmic reticulum protein from a KNRK cell-specific lambda gt11 library using antibodies directed against a putative heparanase amino-terminal peptide. *Int J Cancer* 56(2):286-294.
- Deutz NE, Chamuleau RA, de Graaf AA, Bovee WM, de Beer R. 1988. In vivo ³¹P NMR spectroscopy of the rat cerebral cortex during acute hepatic encephalopathy. *NMR Biomed* 1(2):101-106.
- Duelli R, Maurer MH, Staudt R, Sokoloff L, Kuschinsky W. 2001. Correlation between local glucose transporter densities and local 3-O-methylglucose transport in rat brain. *Neurosci Lett* 310(2-3):101-104.
- Fischbarg J, Kuang KY, Hirsch J, Lecuona S, Rogozinski L, Silverstein SC et al. 1989. Evidence that the glucose transporter serves as a water channel in J774 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(21):8397-8401.
- Fischbarg J, Kuang KY, Vera JC, Arant S, Silverstein SC, Loike J et al. 1990. Glucose transporters serve as water channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(8):3244-3247.
- Hawkins RA, Miller AL, Nielsen RC, Veech RL. 1973. The acute action of ammonia on rat brain metabolism in vivo. *Biochem J* 134(4):1001-1008.
- Jalan R, Damink SW, Deutz NE, Lee A, Hayes PC. 1999. Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* 354(9185):1164-1168.
- Kato M, Hughes RD, Keays RT, Williams R. 1992. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 15(6):1060-1066.
- Katunuma N, Okada M, Nishii Y. 1966. Regulation of the urea cycle and TCA cycle by ammonia. *Adv Enzyme Regul* 4:317-336.
- Krishnan SN, Haddad GG. 1995. Cloning of glucose transporter-3 (GLUT3) cDNA from rat brain. *Life Sci* 56(14):1193-1197.

Kumagai AK, Kang YS, Boado RJ, Pardridge WM. 1995. Upregulation of blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter protein and mRNA in experimental chronic hypoglycemia. *Diabetes* 44(12):1399-1404.

Lai JC, Cooper AJ. 1986. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J Neurochem* 47(5):1376-1386.

Lee AS. 2001. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 26(8):504-510.

Lee SH, Fisher B. 1961. Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 50:668-672.

Leino RL, Gerhart DZ, van Bueren AM, McCall AL, Drewes LR. 1997. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *J Neurosci Res* 49(5):617-626.

Lockwood AH, Ginsberg MD, Rhoades HM, Gutierrez MT. 1986. Cerebral glucose metabolism after portacaval shunting in the rat. Patterns of metabolism and implications for the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *J Clin Invest* 78(1):86-95.

Loike JD, Cao L, Brett J, Ogawa S, Silverstein SC, Stern D. 1992. Hypoxia induces glucose transporter expression in endothelial cells. *Am J Physiol* 263(2 Pt 1):C326-C333.

Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. 1994. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J* 8(13):1003-1011.

Mans AM, DeJoseph MR, Hawkins RA. 1994. Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J Neurochem* 63(5):1829-1838.

Munro S, Pelham HR. 1986. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46(2):291-300.

Nagamatsu S, Kornhauser JM, Burant CF, Seino S, Mayo KE, Bell GI. 1992. Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative

glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem* 267(1):467-472.

Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D. 1983. The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res* 11(6):1759-1771.

Nyberg SL, Cerra FB, Gruetter R. 1998. Brain lactate by magnetic resonance spectroscopy during fulminant hepatic failure in the dog. *Liver Transpl Surg* 4(2):158-165.

Pardridge WM, Triguero D, Farrell CR. 1990. Downregulation of blood-brain barrier glucose transporter in experimental diabetes. *Diabetes* 39(9):1040-1044.

Payne J, Maher F, Simpson I, Mattice L, Davies P. 1997. Glucose transporter Glut 5 expression in microglial cells. *Glia* 21(3):327-331.

Peeling J, Shoemaker L, Gauthier T, Benarroch A, Sutherland GR, Minuk GY. 1993. Cerebral metabolic and histological effects of thioacetamide-induced liver failure. *Am J Physiol* 265(3 Pt 1):G572-G578.

Shetty M, Loeb JN, Ismail-Beigi F. 1992. Enhancement of glucose transport in response to inhibition of oxidative metabolism: pre- and posttranslational mechanisms. *Am J Physiol* 262(2 Pt 1):C527-C532.

Therrien G, Giguere JF, Butterworth RF. 1991. Increased cerebrospinal fluid lactate reflects deterioration of neurological status in experimental portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 6(4):225-231.

Tofteng F, Jorgensen L, Hansen BA, Ott P, Kondrup J, Larsen FS. 2002. Cerebral microdialysis in patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* 36(6):1333-1340.

Tofteng F, Larsen FS. 2002. Monitoring extracellular concentrations of lactate, glutamate, and glycerol by in vivo microdialysis in the brain during liver transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 8(3):302-305.

Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY et al. 2003. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37(2):275-286.

Wertheimer E, Sasson S, Cerasi E, Ben Neriah Y. 1991. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(6):2525-2529.

Zeller K, Rahner-Welsch S, Kuschinsky W. 1997. Distribution of Glut1 glucose transporters in different brain structures compared to glucose utilization and capillary density of adult rat brains. *J Cereb Blood Flow Metab* 17(2):204-209.

Zwingmann C, Chatauret N, Leibfritz D, Butterworth RF. 2003. Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [H-C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* 37(2):420-428.

PARTIE 2 :
CARACTÉRISATION DU MODÈLE D'INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGUË
CAUSÉE PAR L'AZOXYMÉTHANE CHEZ LA SOURIS

Article 4 :

Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure

Neurochemistry International (accepté pour publication le 19/10/2005)

Mireille Bélanger, Jean Côté and Roger F. Butterworth

Unité de Recherche en sciences neurologiques, Hôpital Saint-Luc (CHUM), Montréal,
Québec, Canada, H2X 3J4

Abstract

Molecular biological approaches continue to lead to the identification of alterations in expression of genes coding for key central nervous system proteins involved in water homeostasis, energy metabolism and neurotransmitter regulation in acute liver failure (ALF). However, studies aimed at elucidating the pathophysiological consequences of these changes in gene expression are impeded by the lack of a suitable mouse model of ALF. A previous report described hepatic pathology characteristic of ALF resulting from the administration of azoxymethane (AOM) in mice (Matkowskyj et al., 1999). In a series of experiments to further assess this treatment as an effective model of ALF, the effects of administration of AOM to male C57BL mice on hepatic and cerebral function were studied. With maintenance of body temperature at 37 °C and control of hypoglycemia, mice developed signs of encephalopathy (decreased locomotor activity followed by loss of righting and corneal reflexes) within 16 h of AOM treatment. AOM-treated mice were hyperammonemic, developed spontaneous hypothermia and brain edema. Brain ammonia concentrations were increased to 0.98 ± 0.12 mM at coma stages of encephalopathy. Brain amino acid profiles determined by HPLC were typical of ALF in other species including humans. Mild hypothermia (35°C) led to significant attenuation of brain edema, ammonia, and amino acid changes. These findings demonstrate that AOM treatment affords a simple, reproducible mouse model of ALF which may be suitable for the study of the effects of gene manipulation on the cerebral complications of ALF.

Introduction

Acute liver failure (ALF) may occur following viral infection or as a result of toxic liver injury. Irrespective of its etiology, ALF is associated with serious neurological complications including hepatic encephalopathy, a syndrome characterized by altered mental status that may rapidly progress to stupor and coma. Brain edema resulting in increased intracranial pressure is a second major complication of ALF. If severe, brain edema leads to intracranial hypertension and brain herniation, a common cause of mortality in ALF.

Despite several decades of research, our understanding of the pathogenesis of brain edema and hepatic encephalopathy in ALF remains incomplete. Analyses using the technique of differential display - RT-PCR reveal alterations in the expression of several genes of the central nervous system in rats with ALF induced by hepatic devascularization (Desjardins et al., 2001). Subsequent studies suggest that these changes of expression involve proteins of primary importance for normal CNS function. Examples include the glutamate transporter EAAT-2 (Knecht et al., 1997), the glycine transporter GLYT-1 (Zwingmann et al., 2002), the “peripheral-type” benzodiazepine receptor (PTBR) (Desjardins et al., 1997), the water channel protein Aquaporin IV (Margulies JE et al., 1999) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Belanger et al., 2002). Interestingly, most proteins showing altered expression levels as a result of ALF are located on the astrocyte, a finding which is consistent with astrocytic rather than neuronal changes characteristic of ALF.

Assessing the consequences of these changes in gene expression on CNS function *in vivo* is challenging, particularly in disorders such as ALF where multiple systems are affected. In this regard, the increasing availability of genetically modified animals opens new research avenues that could allow a better understanding of the contribution of such alterations in gene expression in the pathophysiological mechanisms responsible for hepatic encephalopathy and brain edema. Unfortunately, application of such approaches has been hampered by the lack of an appropriate model of ALF in mice, the species most commonly used for manipulations such as gene knockout or overexpression. A number of hepatotoxic drugs have been used to produce ALF, but with limited success. For example the use of acetaminophen-induced hepatotoxicity is limited due to its lack of reproducibility (Terblanche et Hickman, 1991). Thioacetamide has also been used, but variations in toxicity can occur depending on the age and strain of animals, and very little characterization has been performed with this toxin in mice (Sarhan S et al., 1993; Kadota et al., 1996; Itzhak et al., 1995). However, recently, a study by Matkowskyj et al. (Matkowskyj et al., 1999) reported that azoxymethane (AOM) administration to C57Bl mice may provide a novel model for the study of ALF. In the present study, we describe the hepatic and neurobiological consequences of AOM administration to mice and report the protective effects of hypothermia in AOM-induced liver failure. Brain and blood ammonia levels and amino acids concentrations as well as brain water content were measured in animals maintained normothermic or mildly hypothermic following AOM administration.

Materials and Methods

Animals

Male C57BL mice weighing 25 to 30 g were obtained from Charles River, Saint-Constant Qc, Canada) and housed with free access to standard laboratory chow and water under constant conditions of temperature, humidity and light cycling. Mice received a single intraperitoneal injection of AOM (100 µg/g; Sigma, St. Louis, CO) dissolved in 100 µL saline. Control animals received an equivalent volume of saline. Following injection of AOM, body temperature was monitored and maintained at 37°C by means of heating pads (the AOM 37°C group). In the AOM 35°C group, hypothermia occurred spontaneously in the absence of external heating and body temperature was maintained at 35°C using heating pads when necessary. Tail blood glucose concentration was monitored and maintained within normal range by means of subcutaneous injection of a sterile 10% glucose solution (Baxter, Toronto, Canada). When coma stage of encephalopathy was reached (defined as the loss of corneal reflex), normothermic animals were sacrificed by decapitation and brains and livers were rapidly removed. Hypothermic animals were sacrificed in parallel with normothermic and control groups of animals. Animals were handled in accordance with the Guidelines of Canadian Council of Animal care and protocols were approved by the Animal Research Committee at Saint-Luc Hospital (C.H.U.M.).

Liver histology

Livers were fixed overnight by immersion in 10% buffered formalin. Paraffin-embedded specimens were prepared and 6 µM sections were mounted on Vectabond-coated microscope slides (Vector, Burlington, Canada). HPS coloration was performed according

to a standard protocol and liver pathology was assessed by an investigator who was blinded to the experimental treatment groups.

Brain water measurement

Brains were rapidly cut in 2 mm slices and kept at 4°C. 1 mm punch biopsy samples were obtained from the grey matter of the cerebral cortex and water content was measured gravimetrically using a density gradient of bromobenzene-kerosene (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) precalibrated with K₂SO₄ as previously described (Marmarou et al., 1978). The cortical samples were placed onto the fluid column, and the equilibration point was measured after two minutes. The specific gravity of the tissue was calculated and results are expressed as percentage of water content. Six measurements were made per animal and values were arithmetically averaged.

Ammonia measurement

Tail blood ammonia levels were measured using the Ammonia Checker II (AA-4120) (Kyoto Daiichi Kagaku CO, Japan) in conjunction with Ammonia Test Kit strips (Arkray Factory Inc., Japan) according to the manufacturer's protocol. Samples above the detection limit were diluted five fold before measurement and values were corrected according to the dilution factor. Brain ammonia was measured using an ion exchange method. Immediately after decapitation, the head was flash frozen in isopentane cooled to liquid nitrogen temperature and the brain was subsequently chiseled out with special care to keep it frozen at all times. Brains were stored at -70°C until analysis at which time frozen brains were weighed and powdered over liquid nitrogen. Frozen powder was extracted by homogeneization in ice-cold 1 M perchloric acid and centrifuged at 16 000g for 15 min at

4°C. 50 µL of supernatant were added to a suspension of Dowex 50WX8-200 ion exchange resin (Aldrich, WI) and allowed to react for 5 min with constant shaking. After extensive washing, the colorimetric reaction was initiated by the addition of phenol and hypochlorite in the presence of nitroferricyanide. Absorbance was measured using a spectrophotometer at a wavelength of 630 nm.

Plasma and brain amino acid measurements

For brain amino acid analysis, frontal cortices were dissected, weighed and homogenized in 1 M perchloric acid. Plasma samples were deproteinized using 1 M perchloric acid. Samples were mixed by vortexing and the precipitate was removed after centrifugation at 16 000 g for 20 min. The supernatant was neutralized using 25% KHCO₃ and used for derivatization. Amino acid analyses were performed using the Agilent 1100 Chemstation reverse-phase HPLC system (Agilent Technologies, Germany) with fluorescence detection (excitation at 338 nm and emission at 280-900nm) and precolumn o-phthalaldehyde (OPA; Sigma) derivatization. Sample injection was performed using an autosampler with derivatization accessories. A 15 µL sample was reacted at room temperature with 20 µL OPA reagent in the presence of 2-mercaptoethanol (Sigma) for 45 sec. 25 µL of this solution was injected onto the reverse-phase column (BetaBasic C18) fitted with a C18-5 Unigard Column Protection (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA). The chromatogram was eluted with a gradient between methanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) and sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.2 containing 2% tetrahydrofuran (Sigma,)) at a constant flow rate of 2 mL/min. The elution gradient went from 10% to 50% methanol over 40 min, was then held at 50% methanol for another 10

min before re-equilibration with 10 % methanol for 10 min. Peak area was determined using an automated integrator (Agilent Technologies, Germany) and individual amino acid concentrations were calculated in relation to internal standards (homoserine and norvaline) using previously established standard curves.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.D. Comparison of values was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences between groups were evaluated by the post-hoc Turkey Test. A p value < 0.05 was considered to indicate a significant difference.

Results

Physiological data

Following AOM injection all animals developed hypoglycemia and hypothermia that was controlled with careful monitoring. Normothermic animals developed symptoms of encephalopathy progressing from lethargy to ataxia, loss of righting ability and loss of corneal reflex (coma stage) which appeared at 16.5 ± 1.2 h. Hypothermia considerably slowed the onset of encephalopathy with the result that at the time normothermic mice were comatose, hypothermic animals had not started to show significant neurological deterioration.

Liver injury

Histopathological examination of liver sections from mice administered AOM and kept normothermic until coma stages of encephalopathy revealed extensive microvesicular steatosis predominantly located in periportal and midzonal regions. Isolated foci of necrosis were also present and periportal sinusoids appeared dilated and congested (Figure 1, panels

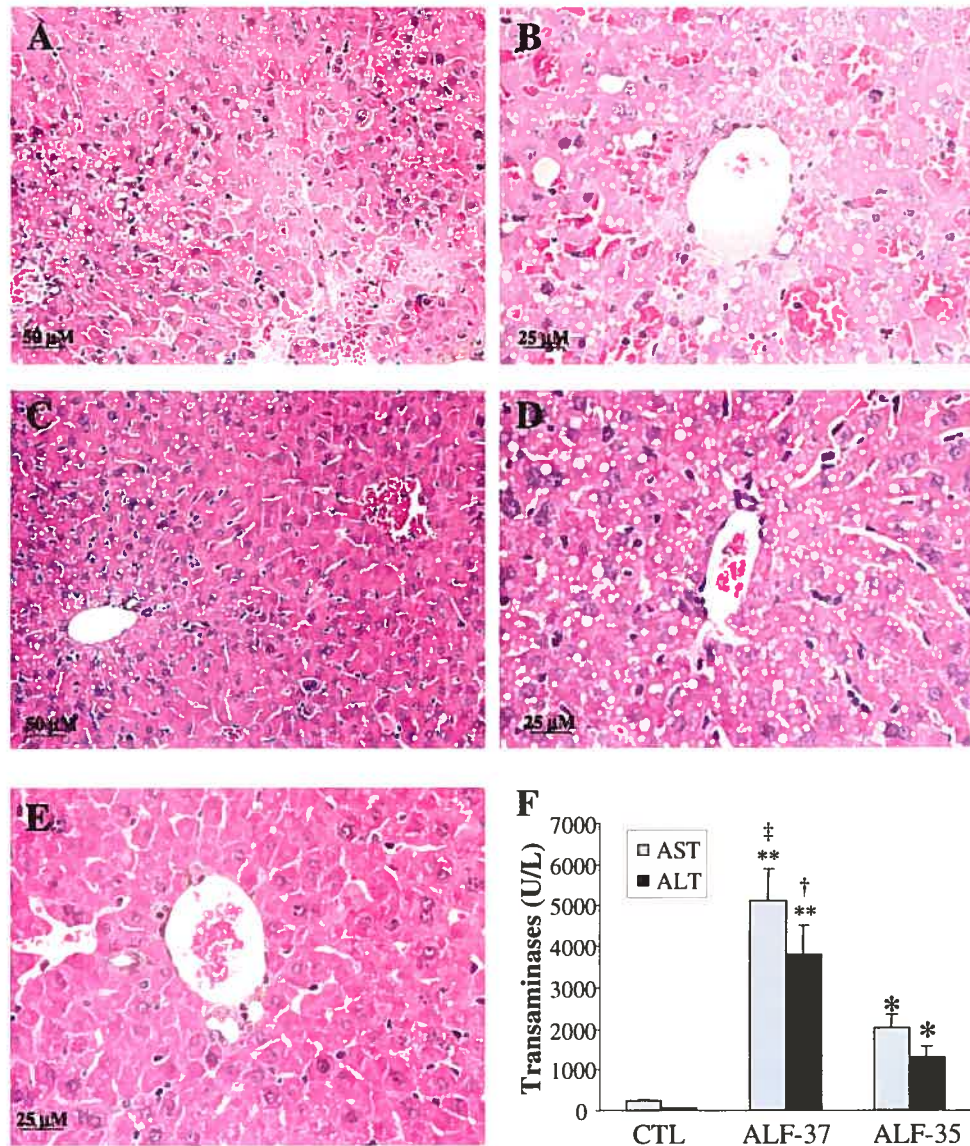


Figure 1 Liver histopathology in C57Bl mice treated with AOM (100 μ g/g) (A) Liver section from a mouse administered AOM and maintained normothermic until coma showing an isolated area of necrosis (HPS; x 200) (B) Liver section from a mouse administered AOM and maintained normothermic until coma. Note the presence of microvesicular steatosis as well as sinusoidal dilatation and congestion in the periportal area (HPS; x 400) (C) and (D) Liver sections from mice administered AOM, maintained mildly hypothermic and sacrificed in parallel with normothermic animals. Note the presence of microvesicular steatosis in the periportal areas with little or no sinusoidal congestion (C: HPS; x 200; D: HPS; x 400) (E) Liver section from a normal mouse (HPS; x 400) (F) Plasma AST and ALT levels in AOM-treated mice. Liver enzymes were elevated in both hypothermia and normothermic groups compared to saline-injected controls (n=5). Hypothermia significantly reduced the elevation of plasma AST and ALT levels compared. Values represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to control group; ** $p < 0.001$ control group; $^{\dagger}p < 0.05$ compared to AOM-35 group; $^{\ddagger}p < 0.001$ compared to AOM-35 group by Analysis of Variance.

A and B). In comparison, hypothermic animals sacrificed in parallel with the normothermic group had more moderate liver damage consisting of microvesicular steatosis restricted to periportal areas with little or no sinusoidal dilatation (Figure 1, panels C and D).

Plasma alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were markedly increased in normothermic AOM-treated mice at coma stages of encephalopathy as well as in hypothermic animals compared to salined-injected controls. However, in accordance with histopathological findings, plasma ALT and AST levels were significantly lower in hypothermic animals compared to normothermic animals (Figure 1 F).

Ammonia levels

AOM-induced ALF resulted in an 8-fold ($p < 0.001$) increase in blood ammonia concentration in normothermic mice. Blood ammonia concentrations were not significantly different between control and hypothermic groups (Figure 2). Brain ammonia concentrations were also elevated 4-fold in normothermic AOM-treated animals compared to control mice ($983.8 \pm 123.4 \mu\text{mol/L}$ vs $241.7 \pm 100.2 \mu\text{mol/L}$; $p < 0.001$), but were not significantly different from controls in AOM-treated animals maintained hypothermic ($177.1 \pm 98.30 \mu\text{mol/L}$) (Figure 2).

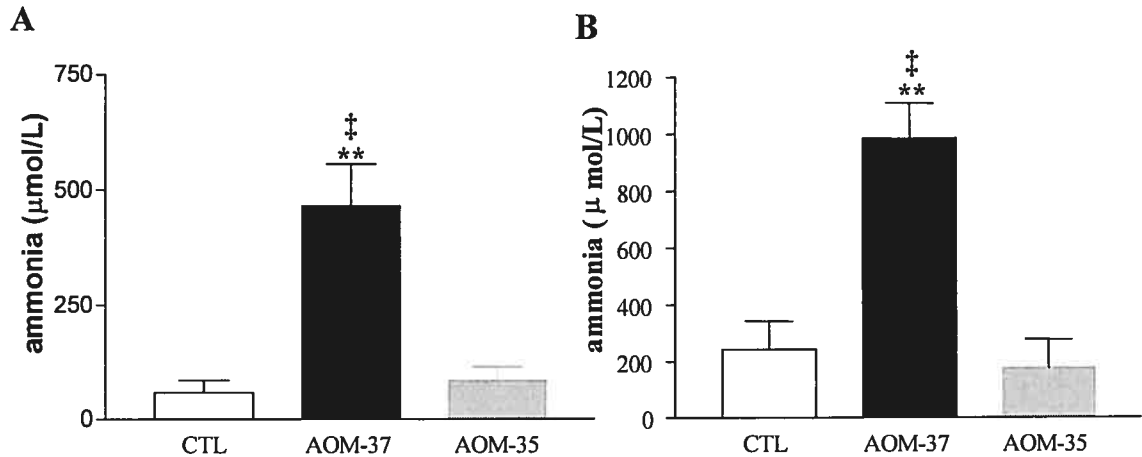


Figure 2. Effects of AOM-induced acute liver failure on blood (A) and brain (B) ammonia levels. (A) Normothermic AOM-treated mice ($n=6$) had significantly higher blood ammonia levels compared to saline-injected ($n=7$) or hypothermic AOM-treated mice ($n=7$) (B) Normothermic AOM-treated mice had significantly higher brain ammonia levels compared to saline-injected or hypothermic AOM-treated mice ($n=4$). Values represent mean \pm SD. ** $p < 0.001$ compared to control group; † $p < 0.001$ compared to AOM-35 group by Analysis of Variance.

Brain water

Mice administered AOM and maintained normothermic showed significantly higher brain water content ($81.93 \% \pm 0.53 \%$) compared to both control mice ($80.72 \% \pm 0.36 \%$; $p < 0.001$) and pair-sacrificed AOM-treated hypothermic animals ($80.98 \% \pm 0.29 \%$; $p < 0.01$) (Figure 3). However, brain water content did not differ significantly between control mice and hypothermic mice administered AOM.

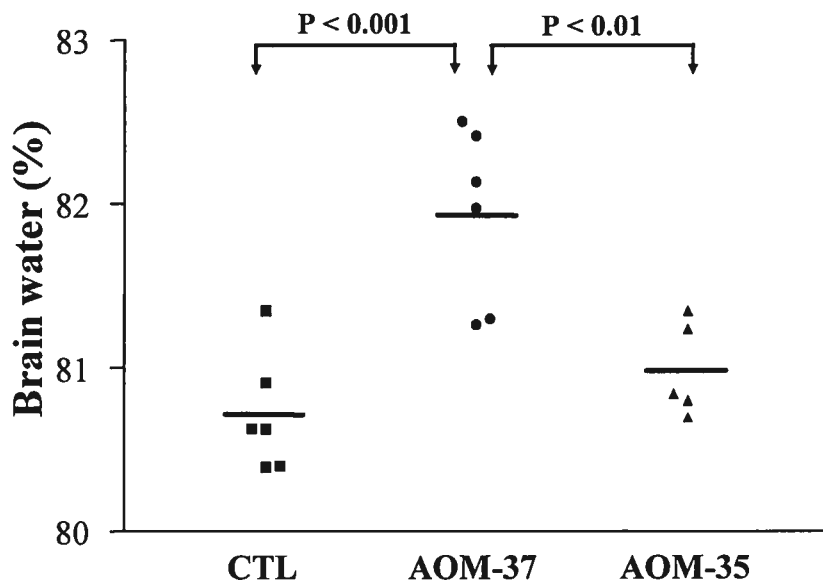


Figure 3. Brain water content in AOM-treated mice compared to control mice. Normothermic AOM-treated mice (●) had significantly higher brain water content compared to saline-injected (■) or hypothermic AOM-treated mice (▲). Data points represent individual animals and horizontal bars indicate mean values. Significant differences between groups are indicated by respective p values.

Amino Acids

Amino acid concentrations were determined in plasma (Table 1) and brain (Table 2) of normothermic and hypothermic animals following AOM-induced ALF. Normothermic animals manifested increased plasma concentrations of glutamate (311 % of controls; $p < 0.01$), glutamine (209 %; $p < 0.01$), taurine (356 %; $p < 0.01$), tyrosine (234 %; $p < 0.01$) and phenylalanine (129 %; $p < 0.05$). In contrast, normothermic animals displayed decreased plasma concentrations of tryptophan (57 % of controls; $p < 0.01$) and branched-chain amino acids isoleucine (77 %; $p < 0.05$) and leucine (66 %; $p < 0.01$). Hypothermia

prevented the increase in plasma concentration of most amino acids with the exception of histidine, threonine and tyrosine; in these cases hypothermia attenuated but did not normalize the increase in plasma concentration (Table 1). Hypothermia did not affect the reduced plasma levels of tryptophan, leucine and isoleucine observed following AOM administration.

Table 1: Plasma amino acids concentration in AOM-induced acute liver failure

Amino acid	CTL (n=6)	AOM-37 (n=6)	AOM-35 (n=5)
Aspartate	42.4 ± 5.9	124.9 ± 47.7**	48.0 ± 3.1 [†]
Glutamate	201.6 ± 27.0	626.9 ± 191.6**	150.9 ± 13.9 [‡]
Asparagine	94.8 ± 10.7	150.1 ± 36.0**	97.0 ± 15.6 [‡]
Histidine	202.9 ± 14.5	360.9 ± 78.9**	319.5 ± 67.3*
Serine	306.5 ± 31.3	444.4 ± 80.3**	326.5 ± 37.2 [†]
Glutamine	1218.4 ± 150.7	2552.6 ± 622.9**	1705.4 ± 141.7 [‡]
Arginine	79.6 ± 5.6	108.2 ± 26.4*	64.3 ± 4.1 [‡]
Threonine	323.6 ± 30.5	743.1 ± 141.0**	515.7 ± 83.0** [‡]
Alanine	844.8 ± 64.6	2443.2 ± 583.2**	1366.3 ± 270.2 [‡]
Taurine	263.5 ± 32.3	827.3 ± 85.1**	319.3 ± 19.7 [‡]
GABA	6.8 ± 1.3	29.7 ± 13.5**	6.9 ± 1.1 [‡]
Tyrosine	465.8 ± 96.0	1090.7 ± 231.8**	805.1 ± 156.1* [†]
Valine	232.2 ± 19.8	202.2 ± 37.8	196.4 ± 37.6
Tryptophan	145.1 ± 16.7	83.5 ± 12.2**	76.9 ± 8.9**
Phenylalanine	178.2 ± 16.6	229.6 ± 51.5*	160.6 ± 12.4 [†]
Isoleucine	173.6 ± 32.2	133.1 ± 19.6*	119.1 ± 8.1*
Leucine	432.0 ± 74.1	285.3 ± 49.7**	269.1 ± 36.7**

Values represent mean ± SD and are expressed in µmol/L.

* p < 0.05 compared to control group

** p < 0.01 compared to control group

[†] p < 0.05 compared to AOM 37°C group

[‡] p < 0.01 compared to AOM 37°C group

Table 2: Frontal cortex amino acids concentration in AOM-induced acute liver failure

Amino acid	CTL (n = 6)	AOM-37 (n = 6)	AOM-35 (n = 5)
Aspartate	2403.1 ± 424.4	2259.7 ± 372.6	2105.9 ± 20.6
Glutamate	18 373.5 ± 2 161.7	15311.0 ± 2 896.5*	19293.4 ± 1584.0 [†]
Asparagine	141.7 ± 16.6	155.2 ± 55.3	182.2 ± 6.5
Histidine	96.8 ± 17.6	200.8 ± 72.1**	203.3 ± 20.0**
Serine	812.3 ± 298.1	967.8 ± 116.2	938.0 ± 63.6
Glutamine	5196.1 ± 603.4	8764.1 ± 2 090.3**	7993.2 ± 1 053.7*
Arginine	93.55 ± 8.9	105.6 ± 27.4	132.0 ± 21.0
Threonine	496.2 ± 91.4	562.8 ± 76.3	482.6 ± 17.8
Alanine	746.2 ± 160.9	1 319.3 ± 456.6**	603.0 ± 69.1 [†]
Taurine	14 799.0 ± 1 814.0	14 627.3 ± 2 696.0	16 340.4 ± 946.5
GABA	1847.5 ± 392.0	2 217.0 ± 543.1	1 553.7 ± 185.3
Tyrosine	541.7 ± 164.5	2 137.0 ± 279.1**	1 352.7 ± 95.2** [‡]
Valine	25.5 ± 6.5	57.4 ± 15.4*	32.4 ± 5.7 [†]
Methionine	36.2 ± 7.2	75.6 ± 20.9**	47.6 ± 2.3 [†]
Tryptophan	3.9 ± 3.5	20.7 ± 4.1**	10.2 ± 0.8* [‡]
Phenylalanine	41.9 ± 8.1	91.1 ± 27.1**	67.9 ± 4.3
Isoleucine	19.7 ± 4.2	37.8 ± 12.7**	26.8 ± 1.0
Leucine	55.8 ± 14.6	93.3 ± 36.9*	75.1 ± 3.2

Values represent mean ± SD and are expressed in nmol/g wet weight

* p < 0.05 compared to control group

** p < 0.01 compared to control group

[†] p < 0.05 compared to AOM 37°C group

[‡] p < 0.01 compared to AOM 37°C group

Normothermic AOM-treated animals manifested decreased brain concentrations of glutamate (83 % of controls; p < 0.05) whereas increased brain concentrations were observed for histidine (207 % of controls; p < 0.01), glutamine (169 %; p < 0.01), alanine (177 %; p < 0.01), methionine (209 %; p < 0.01) as well as aromatic amino acids (tyrosine: 394 %, p < 0.01; tryptophan: 531 %, p < 0.01 and phenylalanine: 217 %, p < 0.01) and branched-chain amino acids (leucine: 167 %, p < 0.05, isoleucine: 192 %, p < 0.01 and

valine: 225% $p < 0.05$) (Table 2). GABA levels were unchanged. Hypothermia prevented changes in brain glutamate, alanine, methionine, phenylalanine, valine, leucine and isoleucine concentrations and attenuated the increase of glutamine and tryptophan concentrations. In contrast, hypothermia did not affect increases in histidine or tyrosine (Table 2).

Discussion

Azoxymethane (AOM) is an active metabolite of the cycad palm nut found on the island of Guam. Recent reports indicate that AOM is also a potent hepatotoxin inducing ALF in mice in a dose-dependent fashion (Matkowskyj et al., 1999; Doering et al., 2002). Liver toxicity has also been reported in humans, livestock and rats following the ingestion of Guam cycad palm nuts (Laqueur et al., 1963), an observation that has been attributed to AOM toxicity (Matkowskyj et al., 1999).

Following administration of 100 $\mu\text{g/g}$ AOM, mice develop acute liver injury mainly characterized by microvesicular steatosis and isolated foci of necrosis. Microvesicular steatosis is a serious condition that may rapidly cause liver failure evolving into stupor, coma and death (Fromenty et Pessayre, 1997). It is observed in several life-threatening conditions such as acute fatty liver of pregnancy, Reye's syndrome, salicylate poisoning and Jamaican vomiting disease (Fromenty et Pessayre, 1995; Causse et al., 1995; Burt et al., 1998). Impairment of mitochondrial β -oxidation is considered to be a key factor in the pathogenesis of microvesicular steatosis (Fromenty et Pessayre, 1995). Interestingly, mitochondrial damage has been observed in the liver following administration of AOM to

mice (Matkowskyj et al., 1999). The precise mechanisms of AOM hepatotoxicity and its effects on mitochondrial β -oxidation, however, are still poorly described.

In the present study, blood ammonia concentrations were increased 8-fold as a result of AOM-induced ALF. These levels are comparable to those reported in ALF patients (Clemmesen et al., 1999) as well as in studies using various models of toxin- or surgically-induced ALF (Zimmermann et al., 1989; Eguchi et al., 1996; Rose et al., 2000). Brain ammonia concentrations typically reach levels between 1 and 5 mM in experimental ALF (Swain et al., 1992; Mans et al., 1994). Following the administration of AOM, brain ammonia concentration was elevated to 0.98 mM. Cytotoxic brain edema is a serious consequence of ALF as it may lead to rises in intracranial pressure and result in brain herniation, a common cause of mortality. Brain water content is consistently increased in toxin- and surgically-induced experimental models of ALF (Rose et al., 2000; Traber et al., 1986; Hilgier et Olson, 1994). Electron microscopic studies reveal that brain edema associated with ALF in humans as well as in experimental models of ALF is cytotoxic in nature and is mainly restricted to astrocytes (Kato et al., 1992; Traber et al., 1987). Accordingly, histological evaluation of the brains of mice with AOM-induced ALF revealed astrocytic swelling in the late stage of encephalopathy (Matkowskyj et al., 1999). Results of the present study confirm the presence of brain edema at coma stages of encephalopathy in mice with AOM-induced ALF.

Increased plasma concentrations of most amino acids were observed in AOM-treated mice. Similar amino acid patterns were reported in patients (Record et al., 1976) as well as in rats (Mans et al., 1994) with ALF. Increased brain glutamine concentrations are a consistent finding in ALF (Swain et al., 1992; Mans et al., 1994; Record et al., 1976;

Chatauret et al., 2003) and are most likely the result of ammonia detoxification by glutamine synthetase (Butterworth, 2002). It has been proposed that increased levels of glutamine may cause an osmotic imbalance and contribute to the pathogenesis of astrocytic swelling in ALF (Jalan et al., 2003). In addition to elevated levels of glutamine, ALF results in increased brain alanine concentrations, possibly as a result of an impairment of oxidative metabolism (Chatauret et al., 2003). Alanine, like glutamine, is osmotically active and may contribute to brain edema, as suggested by results of a study by Swain et al. (Swain et al., 1992) demonstrating that brain alanine concentrations correlate positively with brain water content in rats with ALF. AOM-induced ALF also resulted in increased brain concentrations of the aromatic amino acids tryptophan, penylalanine, tyrosine and histidine, all of which are precursors of neuroactive amines. Increased brain levels of aromatic amino acids are a consistent finding in experimental and human ALF (Albrecht et Jones, 1999; Hazell et Butterworth, 1999).

Recently, much attention has been paid to the protective effects of hypothermia in ALF. Hypothermia has proven to be useful for the management of patients with ALF awaiting liver transplantation (Jalan et al., 1999). In these patients, beneficial effects of hypothermia included lowering of intracranial pressure and improvement of cerebral perfusion pressure. Furthermore, cooling resulted in lowering of arterial ammonia levels and reduction of brain ammonia uptake (Jalan et al., 1999). In a subsequent study, mild hypothermia restored cerebral blood flow autoregulation and uncontrolled intracranial hypertension in patients with ALF (Jalan et al., 2001). Studies in rats with ALF due to hepatic devascularization reveal that hypothermia delays the onset of encephalopathy, attenuates the increase of cerebrospinal fluid ammonia concentration and prevents the increase in brain water content (Rose et al., 2000; Chatauret et al., 2001). In addition,

studies using ^{13}C - Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy show that hypothermia prevents alterations of cerebral energy metabolism in ALF rats including normalization of *de novo* synthesis of lactate and alanine (Chatauret et al., 2003). Results of the present study demonstrate that mild hypothermia prevents increases in both plasma and brain ammonia concentrations (Figure 2) and normalizes blood and brain amino acid patterns (Tables 1 and 2). Moreover, increased brain water content was prevented in hypothermic AOM-treated animals (Figure 3). In contrast to these findings, results of a previous study showed that mild hypothermia did not prevent increases in plasma ammonia concentration in rats following hepatic devascularisation (Chatauret et al., 2001). This inconsistency most likely reflects differences in the type of liver injury (toxic versus ischemic) in the two models. Indeed, results of the present study indicate that mild hypothermia delays liver damage *per se* in AOM-treated mice, a factor that could itself prevent rises in plasma ammonia concentrations. Reduced blood ammonia concentration may in turn help prevent the occurrence of brain edema in hypothermic animals in the present study.

In summary, results of the present study demonstrate that administration of AOM to male C57Bl mice provides a simple, reproducible model for the study of the cerebral complications ALF. Importantly, this model recapitulates the cardinal features of ALF, namely encephalopathy, brain edema, hyperammonemia and altered amino acid profiles. The AOM model of ALF has the potential to facilitate future studies involving genetic manipulations (ie. transgenics, knockouts). Such studies could significantly improve current understanding of pathophysiological mechanisms responsible for encephalopathy and brain edema in ALF.

Acknowledgements

Studies were funded by the Canadian Institute for Health Research (CIHR). Mireille Bélanger is a recipient of a CIHR Doctoral Research Award.

References

- Albrecht, J, Jones, EA, 1999. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J. Neurol. Sci.* 170, 138-146.
- Belanger, M, Desjardins, P, Chatauret, N, Butterworth, RF, 2002. Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem. Int.* 41, 155-160.
- Burt, AD, Mutton, A, Day, CP, 1998. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin. Diagn. Pathol.* 15, 246-258.
- Butterworth, RF, 2002. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis.* 17, 221-227.
- Causse, X, Gargot, D, Michenet, P, 1995. [Liver steatosis. II: Microvesicular steatosis]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 19, 66-75.
- Chatauret, N, Rose, C, Therrien, G, Butterworth, RF, 2001. Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure. *Metab Brain Dis.* 16, 95-102.
- Chatauret, N, Zwingmann, C, Rose, C, Leibfritz, D, Butterworth, RF, 2003. Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: a H/C-nuclear magnetic resonance study. *Gastroenterology* 125, 815-824.
- Clemmesen, JO, Larsen, FS, Kondrup, J, Hansen, BA, Ott, P, 1999. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29, 648-653.
- Desjardins, P, Bandeira, P, Raghavendra, R, V, Ledoux, S, Butterworth, RF, 1997. Increased expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor-isoquinoline carboxamide binding protein mRNA in brain following portacaval anastomosis. *Brain Res.* 758, 255-258.
- Desjardins, P, Belanger, M, Butterworth, RF, 2001. Alterations in expression of genes coding for key astrocytic proteins in acute liver failure. *J. Neurosci. Res.* 66, 967-971.

Doering, CB, Josephson, CD, Craddock, HN, Lollar, P, 2002. Factor VIII expression in azoxymethane-induced murine fulminant hepatic failure. *Blood* 100, 143-147.

Eguchi, S, Kamlot, A, Ljubimova, J, Hewitt, WR, Lebow, LT, Demetriou, AA, Rozga, J, 1996. Fulminant hepatic failure in rats: survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. *Hepatology* 24, 1452-1459.

Fromenty, B, Pessayre, D, 1995. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 67, 101-154.

Fromenty, B, Pessayre, D, 1997. Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. *J. Hepatol.* 26 Suppl 2, 43-53.

Hazell, AS, Butterworth, RF, 1999. Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 99-112.

Hilgier, W, Olson, JE, 1994. Brain ion and amino acid contents during edema development in hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.* 62, 197-204.

Itzhak, Y, Roig-Cantisano, A, Dombro, RS, Norenberg, MD, 1995. Acute liver failure and hyperammonemia increase peripheral-type benzodiazepine receptor binding and pregnenolone synthesis in mouse brain. *Brain Res.* 705, 345-348.

Jalan, R, Damink, SW, Deutz, NE, Lee, A, Hayes, PC, 1999. Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* 354, 1164-1168.

Jalan, R, Olde Damink, SW, Deutz, NE, Hayes, PC, Lee, A, 2001. Restoration of cerebral blood flow autoregulation and reactivity to carbon dioxide in acute liver failure by moderate hypothermia. *Hepatology* 34, 50-54.

Jalan, R, Shawcross, D, Davies, N, 2003. The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 1175-1181.

- Kadota, Y, Inoue, K, Tokunaga, R, Taketani, S, 1996. Induction of peripheral-type benzodiazepine receptors in mouse brain following thioacetamide-induced acute liver failure. *Life Sci.* 58, 953-959.
- Kato, M, Hughes, RD, Keays, RT, Williams, R, 1992. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 15, 1060-1066.
- Knecht, K, Michalak, A, Rose, C, Rothstein, JD, Butterworth, RF, 1997. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci. Lett.* 229, 201-203.
- Laqueur, GL, Mickelsen, O, Whiting, MG, Kurland, LT, 1963. Carcinogenic properties of nuts from *Cycas Circinalis* L. indigenous to Guam. *J. Natl. Cancer Inst.* 31, 919-951.
- Mans, AM, DeJoseph, MR, Hawkins, RA, 1994. Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J. Neurochem.* 63, 1829-1838.
- Margulies JE, Thompson RC, Demetriou AA, 1999. Aquaporin-4 water channel is upregulated in the brain in fulminant hepatic failure [Abstract]. *Hepatology* 30, 395A
- Marmarou, A, Poll, W, Shulman, K, Bhagavan, H, 1978. A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J. Neurosurg.* 49, 530-537.
- Matkowskyj, KA, Marrero, JA, Carroll, RE, Danilkovich, AV, Green, RM, Benya, RV, 1999. Azoxymethane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model. *Am. J. Physiol* 277, G455-G462.
- Record, CO, Buxton, B, Chase, RA, Curzon, G, Murray-Lyon, IM, Williams, R, 1976. Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy. *Eur. J. Clin. Invest* 6, 387-394.
- Rose, C, Michalak, A, Pannunzio, M, Chatauret, N, Rambaldi, A, Butterworth, RF, 2000. Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology* 31, 872-877.

Sarhan S, Knodgen B, Grauffel C, Seiler N, 1993. Effects of inhibition of ornithine aminotransferase on thioacetamide-induced hepatogenic encephalopathy. *Neurochem Res.* 18, 539-549.

Swain, M, Butterworth, RF, Blei, AT, 1992. Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 15, 449-453.

Terblanche, J, Hickman, R, 1991. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig. Dis. Sci.* 36, 770-774.

Traber, PG, Dal Canto, M, Ganger, DR, Blei, AT, 1987. Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology* 7, 1272-1277.

Traber, PG, Ganger, DR, Blei, AT, 1986. Brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatitis. Regional differences and effects on intracranial pressure. *Gastroenterology* 91, 1347-1356.

Zimmermann, C, Ferenci, P, Pifl, C, Yurdaydin, C, Ebner, J, Lassmann, H et al., 1989. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology* 9, 594-601.

Zwingmann, C, Desjardins, P, Hazell, A, Chatauret, N, Michalak, A, Butterworth, RF, 2002. Reduced expression of astrocytic glycine transporter (Glyt-1) in acute liver failure. *Metab Brain Dis.* 17, 263-273.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Anomalies de la fonction astrocytaire associées à l'IHA

Nombre d'études portant sur les conséquences cérébrales de l'insuffisance hépatique indiquent que l'astrocyte est le type cellulaire le plus affecté dans le SNC suite à la dysfonction hépatique, tant d'un point de vue morphologique que physiologique. Rappelons tout d'abord que l'insuffisance hépatique chronique est caractérisée par l'apparition d'un ensemble de changements morphologiques des astrocytes nommés astrocytose Alzheimer de type II (Butterworth, 1998), alors que l'insuffisance hépatique aiguë cause plutôt un gonflement des astrocytes périvasculaires et périneuronaux (Hanid et al., 1979; Traber et al., 1987; Kato et al., 1992).

Les astrocytes subissent également d'importants dérangements physiologiques lors de l'insuffisance hépatique. L'une des raisons pouvant en partie expliquer la vulnérabilité particulière des astrocytes lors de l'IHA réside dans le fait que ceux-ci possèdent des prolongements dits « périvasculaires » qui recouvrent la totalité de la surface des capillaires sanguins cérébraux et constituent donc, mis à part les cellules endothéliales elles-mêmes, la première ligne de défense contre certaines toxines accumulées dans le sang et pouvant traverser la BHE. Parmi celles-ci, l'ammoniaque semble jouer un rôle central. En effet, des quantités considérables d'ammoniaque atteignent le cerveau lors de l'IHA (de l'ordre de 1 à 5 mM) (Butterworth, 1998) et, en raison de la localisation astrocytaire de la GS (Norenberg et Martinez-Hernandez, 1979), l'immense majorité de la détoxification cérébrale de l'ammoniaque survient dans les astrocytes, qui doivent alors faire face à une augmentation importante de leur concentration intracellulaire de glutamine (voir équation 4; chapitre 1). L'effet osmotique de cette accumulation intracellulaire de glutamine peut ensuite favoriser

l'entrée d'eau dans la cellule, contribuant au gonflement des astrocytes (Takahashi et al., 1990).

De plus, certaines études récentes suggèrent que l'accumulation de glutamine peut avoir d'autres effets délétères sur les astrocytes. En effet, l'exposition de cultures d'astrocytes à des concentrations de glutamine de l'ordre de la millimole déclenche la transition de la perméabilité mitochondriale (MPT) (Rama Rao et al., 2003b) qui elle-même induit un accroissement de la production de radicaux libres (Jayakumar et al., 2004). Il est intéressant de noter que l'inhibition de la glutaminase activée par les phosphates, une enzyme située exclusivement dans les mitochondries, prévient la production de radicaux libres suite à l'administration de glutamine. Cela suggère que l'hydrolyse de la glutamine, un événement mitochondrial, cause l'accumulation d'un surplus d'ammoniaque dans cet organelle (Jayakumar et al., 2004), ce qui pourrait expliquer l'induction du MPT, puisque l'ammoniaque lui-même induit également le MPT dans les astrocytes en culture (Bai et al., 2001). Bien qu'il soit possible que ce mécanisme survienne dans les astrocytes en culture, qui selon plusieurs études expriment la glutaminase activée par les phosphates (Schousboe et al., 1979; Kvamme et al., 1982), un tel effet de la glutamine sur les astrocytes *in vivo* reste à démontrer. Il existe en effet une controverse concernant l'expression de la glutaminase activée par les phosphates par les astrocytes *in vivo*, puisqu'on considère généralement que cette enzyme est sélectivement exprimée par les neurones. Toutefois, quelques études suggèrent également la présence de la glutaminase activée par les phosphates dans les cellules gliales du SNC (Subbalakshmi et Murthy, 1985; Rao et Murthy, 1992; Takatsuna et al., 1994).

Mentionnons également que le gonflement lui-même des astrocytes produit également de multiples modifications de la fonction cellulaire. En effet, une importante

dépolarisation de la membrane plasmique survient lors du gonflement des astrocytes (Kimmelberg et Kettenmann, 1990). Cette dépolarisation de la membrane plasmique des astrocytes affecte les gradients ioniques nécessaires au fonctionnement normal d'un grand nombre de transporteurs, par exemple les transporteurs astrocytaires du glutamate. Il semble également que le gonflement cellulaire lui-même (quelle qu'en soit l'origine) puisse contribuer au stress oxydatif et entraîner la nitration des résidus tyrosine des protéines (Schliess et al., 2004).

Enfin, il est maintenant clair que les astrocytes subissent aussi diverses modifications de leur expression génique lors de l'IHA. Parmi celles-ci, on compte la baisse de l'expression du transporteur du glutamate EAAT-2, du transporteur de la glycine Glyt1 et du canal osmotique aquaporine-4 (voir section 4, chapitre 1). Ces changements affectent donc des protéines participant à une vaste gamme de fonctions cellulaires. Les résultats de la présente étude confirment l'existence d'anomalies de l'expression génique astrocytaire lors de l'IHA. Nous avons en effet démontré que l'IHA due à la dévascularisation hépatique cause des modifications de l'expression de gènes codant pour trois protéines astrocytaires supplémentaires jouant un rôle dans diverses fonctions cellulaires, soit:

- (1) La protéine glio-fibrillaire acide (GFAP); une protéine de structure du cytosquelette,
- (2) Le récepteur des benzodiazépines de type périphérique (PTBR); une protéine impliquée dans le transport mitochondrial du cholestérol, et
- (3) Le transporteur facilitatif du glucose GLUT1, impliqué dans le métabolisme énergétique cellulaire

1.1 La protéine glio-fibrillaire acide (GFAP)

1.1.1 Modification de l'expression de la GFAP lors de l'insuffisance hépatique

Dans l'article 1, nous avons entrepris l'étude de l'expression de la GFAP dans le modèle d'IHA causée par la dévascularisation hépatique chez le rat. Les résultats de cette étude démontrent une baisse progressive de l'expression de la GFAP dans le cortex frontal chez ce modèle animal d'IHA (Figures 1 et 3, article 1), apparaissant très tôt dans la progression de l'EH, soit dès six heures après l'induction de l'IHA. Il est intéressant de constater que la baisse d'expression de la protéine est précédée par une diminution des niveaux de l'ARNm codant pour la GFAP (Figure 1, article 1). Compte tenu de la concentration élevée d'ammoniaque observée dans le cerveau lors de l'IHA, la perte d'expression de l'ARNm codant pour la GFAP rapportée ici n'est pas sans rappeler les résultats d'une étude de Neary et collègues (1994) démontrant une baisse d'expression de la GFAP causée par la déstabilisation spécifique de l'ARNm codant pour la GFAP dans des cultures d'astrocytes exposées à l'ammoniaque. D'autre part, notre étude ne démontre aucun changement de l'expression de la protéine S100 β (Figure 2, article 1), une protéine impliquée dans la phosphorylation de la GFAP (Ziegler et al., 1998) et dans l'organisation du cytosquelette en général (Donato, 2003). L'absence de changement des niveaux d'expression de la S100 β et de l'actine- β (Figure 2, article 1) suggère que l'IHA cause une perte spécifique de l'expression de la GFAP, et non pas une désorganisation généralisée du cytosquelette dans le cerveau de ces animaux.

Alors que notre étude démontre pour la première fois une baisse de l'expression de la GFAP lors de l'IHA, plusieurs études se sont intéressées à l'expression de la GFAP dans la forme chronique de l'encéphalopathie hépatique. Dans leur ensemble, les études *post-*

mortem évaluant l'immunoréactivité de la GFAP dans le cerveau de patients atteints d'une insuffisance hépatique chronique s'entendent pour dire qu'il y a une baisse d'expression de la GFAP dans le cortex cérébral (Sobel et al., 1981; Kretzschmar et al., 1985; Kimura et Budka, 1986), les ganglions de la base (Sobel et al., 1981; Kretzschmar et al., 1985) et le thalamus (Sobel et al., 1981), alors que l'immunoréactivité de la GFAP est inchangée dans la matière blanche cérébrale chez ces mêmes patients (Sobel et al., 1981; Kretzschmar et al., 1985; Kimura et Budka, 1986). Cependant, chez le rat ayant subi une anastomose porto-cave, un modèle de dysfonction hépatique chronique, le patron d'immunoréactivité de la GFAP est plus difficile à cerner. On observe généralement une diminution de l'immunoréactivité de la GFAP, en particulier dans le cortex cérébral (Norenberg, 1977), la couche granulaire cérébelleuse et la matière blanche du cervelet (Suarez et al., 1992), ainsi que dans la lame gliale ventrale du noyau supraoptique (Suarez et al., 1996), alors que l'immunoréactivité de la GFAP augmente dans certaines populations d'astrocytes dont les cellules gliales de Bergmann du cervelet (Suarez et al., 1992) ainsi que dans les astrocytes du noyau supraoptique (Suarez et al., 1996). D'autre part, comme c'est également le cas dans notre modèle d'EH aiguë chez le rat, l'expression de la protéine S100 β n'est pas changée chez les patients atteints d'EH chronique (Kimura et Budka, 1986).

1.1.2 Facteurs modifiant l'expression de la GFAP

Les facteurs responsables de la baisse d'expression de la GFAP dans le cortex frontal lors de l'EH chronique ou aiguë ne sont pas connus. Toutefois, comme nous l'avons mentionné plus haut, certaines études indiquent un rôle possible de l'ammoniaque. Un lien entre l'hyperammoniémie et la perte de la GFAP a d'abord été suggéré par une étude rapportant une tendance à la baisse de l'immunoréactivité de la GFAP chez des rats soumis

à une diète riche en ammoniacque (Bodega et al., 1993). D'autre part, l'exposition de cultures d'astrocytes à des concentrations croissantes d'ammoniacque cause une baisse proportionnelle de l'expression de la GFAP (Norenberg et al., 1990; Neary et al., 1994). Il a en effet été démontré que l'ammoniacque induit, à des doses comparables à celles observées dans le cerveau lors de l'IHA, une perte de stabilité de l'ARNm de la GFAP d'environ 50 %, alors que le niveau de transcription de la GFAP demeure inchangé dans ces cellules (Neary et al., 1994).

Mis à part l'ammoniacque, l'expression de la GFAP peut être modifiée par de nombreux facteurs circulants parmi lesquels on compte certaines cytokines (Oh et al., 1993; Balasingam et al., 1994; Laping et al., 1994), les glucocorticoïdes (O'Callaghan et al., 1989; De Nicola et al., 1998), les hormones stéroïdiennes (Day et al., 1993), ainsi que les hormones thyroïdiennes (Lima et al., 1997). Cependant, très peu d'informations concernant le rôle ainsi que les concentrations cérébrales respectives de ces facteurs lors de l'IHA sont présentement disponibles, si bien que l'implication d'un ou plusieurs de ces facteurs dans les modifications de l'expression de la GFAP survenant lors de l'IHA, bien qu'elle ne puisse être exclue, reste très incertaine.

1.1.3 Conséquences d'une perte d'expression de la GFAP

La disponibilité de souris « knock-out » dont l'expression de la GFAP est supprimée a permis une meilleure compréhension des fonctions cellulaires de la GFAP (Pekny, 2001). Parmi ces fonctions, il semble que la GFAP soit impliquée dans la résistance mécanique du cerveau, comme le suggère une étude démontrant une sensibilité accrue des souris déficientes en GFAP dans un modèle de percussion cérébrale (Nawashiro et al., 1998). D'autre part, la GFAP, de concert avec la vimentine, autre protéine des

filaments intermédiaires, est impliquée dans la régulation du volume des astrocytes. En effet, lorsque mis en culture, les astrocytes dépourvus de filaments intermédiaires relâchent moins de taurine en réaction à un stress hypotonique que les astrocytes normaux, suggérant une anomalie de leur mécanismes de régulation du volume intracellulaire (Ding et al., 1998). De plus, l'exposition de cultures d'astrocytes à l'ammoniaque cause une augmentation du volume intracellulaire concomitante à une perte d'expression de la GFAP (Norenberg et al., 1990; Norenberg et al., 1991).

Les résultats de la présente étude suggèrent un rôle de la GFAP dans les mécanismes responsables de l'apparition de l'œdème cérébral lors de l'IHA (article 1). En effet, lorsque l'on met en relation l'expression moyenne de la GFAP en fonction du contenu en eau pour chaque groupe étudié, on observe un lien entre la perte d'expression de la GFAP et l'apparition de l'œdème cérébral lors de la progression de l'encéphalopathie (Figure 3.1, ci-dessous).

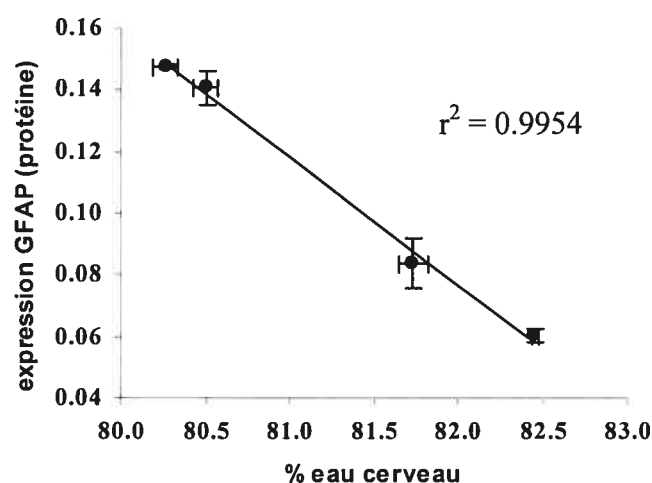


Figure 3.1 Relation négative entre le niveau d'expression de la GFAP et l'œdème cérébral dans le cerveau de rats ayant une IHA

Le mécanisme précis par lequel une baisse d'expression de la GFAP contribue à l'œdème cérébral lors de l'IHA est inconnu, mais certains suggèrent qu'une diminution de l'expression de la GFAP cause une altération des propriétés visco-élastiques des astrocytes, facilitant leur gonflement (Neary et al., 1994). D'autre part, une diminution de l'expression de la GFAP est associée à une importante hausse de la concentration intracellulaire de glutamine qui augmente de 150 % dans les cultures d'astrocytes de souris GFAP +/- et de 200 % dans les astrocytes de souris GFAP -/- (Pekny et al., 1999). Ainsi, en plus de la production astrocytaire de glutamine reliée à la détoxification de l'ammoniaque, il est possible que la baisse d'expression de la GFAP contribue à une accumulation supplémentaire de glutamine dans les astrocytes lors de l'IHA qui, rappelons-le, est un facteur important impliqué dans l'apparition de l'œdème cérébral.

Bien qu'une baisse d'expression de la GFAP survienne tant lors de l'insuffisance hépatique chronique qu'aiguë, il est important de souligner que l'œdème cérébral sévère ne se développe que lors de l'IHA, alors que l'EH chronique est au plus associée à un œdème cérébral léger (« low grade »). Une explication possible à cette divergence entre les formes chronique et aiguë de l'EH est la nature multifactorielle de l'œdème cérébral associé à l'IHA. Il est en effet possible que les altérations de l'architecture cellulaire causées par la baisse de la GFAP, associées à l'accumulation importante de glutamine et aux changements hémodynamiques survenant lors de l'IHA contribuent ensemble à l'apparition d'un œdème cérébral sévère. D'autre part, il est possible que, contrairement à l'IHA, qui présente une progression très rapide, l'évolution lente de l'encéphalopathie hépatique chronique favorise la mise en place de mécanismes compensatoires permettant de minimiser les changements du volume cérébral (Haussinger et al., 2000).

1.2 Le récepteur des benzodiazépines de type périphérique (PTBR)

1.2.1 Modification de l'expression de PTBR lors de l'insuffisance hépatique

Dans un deuxième temps, les résultats de la présente étude démontrent une hausse de l'expression de PTBR dans le cortex frontal de rats en coma hépatique causé par la dévascularisation hépatique (Article 2). PTBR est un récepteur des benzodiazépines situé sur la membrane mitochondriale des cellules gliales, et en particulier des astrocytes (voir section 4.6 de l'Introduction). Aux stades avancés de l'encéphalopathie, on observe une hausse des niveaux d'ARNm de la sous-unité IBP (Figure 2, Article 2) et une augmentation concomitante du nombre de sites de liaison du [3 H]PK11195 (Figure 3, Article 2), un ligand spécifique de PTBR, dans le cortex frontal de rats ayant une IHA. Il est important de préciser que les études précédentes démontrant une augmentation de l'expression de PTBR lors de l'IHA faisaient appel à la thioacétamide afin d'induire la dysfonction hépatique (Itzhak et al., 1995; Kadota et al., 1996). Or, il a été démontré que la thioacétamide traverse la BHE et produit une mort neuronale chez le rat (Peeling et al., 1993), ce qui rend cette drogue inappropriée pour l'étude des complications neurologiques de l'IHA, puisque la mort neuronale n'est pas une caractéristique propre à cette condition. Contrairement aux modèles faisant usage de la thioacétamide, la mort neuronale et la gliose réactionnelle qui en résulte ne sont pas observées dans notre modèle expérimental d'IHA, ce qui permet de penser que la hausse de l'expression de PTBR observée dans la présente étude n'est pas simplement due à une prolifération des cellules gliales survenant suite à la mort neuronale.

Depuis quelques années, on porte un intérêt grandissant aux effets protecteurs de l'hypothermie légère sur la fonction cérébrale lors de l'IHA. Il est important de mieux comprendre les mécanismes par lesquels l'hypothermie agit afin d'en faciliter

l'introduction dans la pratique clinique courante. La présente étude confirme les résultats d'études précédentes démontrant que l'hypothermie légère protège contre l'apparition de l'œdème cérébral lors de l'IHA (Figure 1, Article 2) (Rose et al., 2000; Chatauret et al., 2003). De plus, l'hypothermie atténue l'augmentation de l'expression de PTBR et prévient la hausse de la concentration cérébrale de pregnénolone qui en résulte (Figure 4, Article 2). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'induction de PTBR est l'un des mécanismes contribuant à l'effet protecteur de l'hypothermie légère lors de l'IHA et supportent l'hypothèse selon laquelle PTBR et les neurostéroïdes sont impliqués dans les mécanismes responsables de l'œdème cérébral associé à l'IHA (voir section 1.2.3, ci-dessous).

De façon similaire à nos résultats chez le rat ayant une IHA, de nombreuses études démontrent que l'insuffisance hépatique chronique entraîne une régulation à la hausse de PTBR. Ainsi, le nombre de sites de liaison du PK11195, un antagoniste spécifique de PTBR, est augmenté dans le cortex frontal et les noyaux caudés de patients décédés suite d'un coma hépatique (Lavoie et al., 1990). Une étude d'immunobuvardage réalisée grâce à des anticorps spécifiques à la sous-unité IBP du récepteur PTBR suggère que l'augmentation de l'expression de IBP dans des échantillons de cortex cérébral prélevés à l'autopsie chez des patients ayant une EH chronique est associée à la présence d'astrocytes Alzheimer de type II (confirmée par un examen pathologique) puisque les patients ayant une EH en l'absence d'astrocytose Alzheimer de type II ne présentent pas de hausse d'expression de PTBR (Bélanger et al., 2003).

D'autre part, une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour IBP, accompagnée d'une hausse du nombre de sites de liaison du PK11195 sont aussi observées dans le cerveau de rats suite à une anastomose porto-cave, un modèle de dysfonction hépatique chronique (Rao et al., 1994; Leong et al., 1994; Desjardins et al., 1999a). Ces

animaux présentent également une augmentation de l'expression de PTBR dans les reins, alors que l'expression de PTBR est à la baisse dans les testicules (Rao et al., 1994; Desjardins et al., 1999a). Ces changements d'expression de PTBR dans les organes de la périphérie sont possiblement la conséquence de l'hyperthrophie et de l'atrophie respective des reins et des testicules suite à l'anastomose porto-cave (Rao et al., 1994; Desjardins et al., 1999a).

1.2.2 Facteurs modifiant l'expression de PTBR

1.2.2.1 L'ammoniaque

L'hyperammoniémie est généralement accompagnée d'une hausse de l'expression cérébrale de PTBR et joue vraisemblablement un rôle central dans l'induction de PTBR lors de la dysfonction hépatique. On observe en effet une augmentation du nombre de sites de liaison de PTBR dans le cerveau de souris rendues hyperammoniémiques suite à l'administration de sels d'ammonium (Itzhak et al., 1995), dans le cerveau de souris ayant une hyperammoniémie congénitale causée par le défaut d'une enzyme du cycle de l'urée (Rao et al., 1993), ainsi que dans les cultures d'astrocytes exposées à l'ammoniaque (Itzhak et Norenberg, 1994a). Il est donc raisonnable de penser que l'induction de PTBR observée dans le cerveau de rats ayant une IHA soit causée par l'augmentation de la concentration cérébrale d'ammoniaque. Dans le même ordre d'idée, il est possible que la baisse de la capture d'ammoniaque par le cerveau obtenue grâce à l'hypothermie légère (Rose et al., 2000) soit l'un des mécanisme expliquant l'effet protecteur de l'hypothermie sur l'induction de PTBR dans ce modèle d'IHA (Figures 2 et 3, Article 2).

1.2.2.2 Le stress

Le stress est un autre facteur capable de modifier l'expression de PTBR. Par exemple, un stress aigu causé par l'administration d'une forte dose d'électrochocs cause une augmentation de l'expression de PTBR dans le cortex cérébral (Basile et al., 1987). Le stress chirurgical aigu inhérent à la laparotomie (Okun et al., 1988) ainsi que le stress causé par la nage forcée (Novas et al., 1987) causent également une régulation à la hausse du nombre de sites spécifiques de PTBR. Contrairement à l'effet du stress aigu, le stress chronique induit par l'administration répétée d'électrochocs cause une baisse de l'expression de PTBR dans le cortex cérébral (Drugan et al., 1986). Notons que dans le but d'éviter tout biais causé par le stress dans notre étude, les groupes expérimentaux ont été soumis à des manipulations similaires. Ainsi les animaux contrôles ont été soumis à la manipulation par l'expérimentateur, l'anesthésie, la laparotomie de même que le clampage de la veine porte et de la veine cave pour une durée équivalente à celle nécessaire à la construction de l'anastomose porto-cave.

1.2.2.3 Le manganèse

L'exposition de cultures primaires d'astrocytes au manganèse cause une augmentation du nombre de sites de liaison spécifiques de PTBR (Hazell et al., 1999). De plus, dans un modèle de toxicité par inhalation du manganèse chez le rat, on observe une importante augmentation de la concentration de manganèse dans le globus pallidus, accompagnée d'une augmentation de l'expression de PTBR dans cette même région (Hazell et al., 2003). Ces études suggèrent un rôle de l'accumulation cérébrale de manganèse dans l'induction de PTBR observée dans le cerveau de patients lors de l'insuffisance hépatique chronique (Hazell et Butterworth, 1999). Il est toutefois peu probable qu'un tel mécanisme soit en cause dans l'induction de PTBR lors de l'IHA

puisque la concentration cérébrale de manganèse est inchangée lors de l'IHA (Rose et al., 1999a).

1.2.3 Conséquences d'une induction de l'expression de PTBR

En raison des nombreuses fonctions cellulaires attribuées à PTBR, il est difficile de déterminer avec certitude l'effet d'un changement d'expression de ce dernier. Toutefois, la fonction la mieux connue de PTBR est sans doute son rôle dans le transport du cholestérol dans la mitochondrie, un événement nécessaire à la stéroïdogénèse. Le concept voulant que le cerveau soit un organe actif de la stéroïdogénèse n'a émergé qu'assez récemment, dans les années 1980, et a depuis permis de mettre en évidence de nombreux effets modulateurs de cette nouvelle classe de molécules sur la fonction du SNC. La figure 3.2 donne un aperçu des voies actives de synthèse des neurostéroïdes dans le SNC.

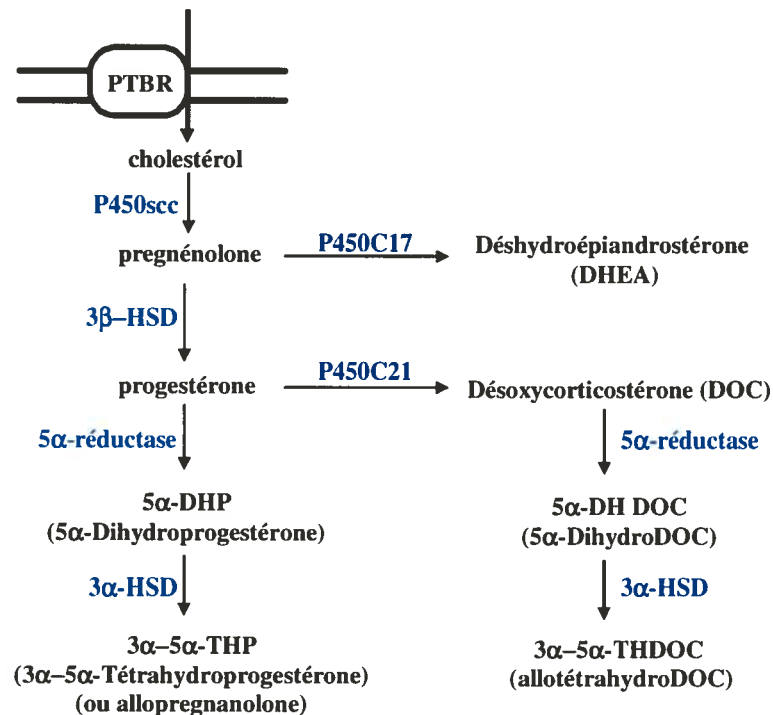


Figure 3.2 Voies de synthèse des neurostéroïdes. Les enzymes de synthèse sont indiqués en bleu. P450scc: « cholesterol side chain cleavage », 3β-HSD: 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase, 3α-HSD: 3α-hydroxystéroïde déshydrogénase, P450C21: 21-hydroxylase, P450C17: 17α-hydroxylase/17,20-lyase.

Plusieurs études suggèrent qu'une activation de ces voies de synthèse causée par l'induction de PTBR soit impliquée dans les mécanismes responsables des complications cérébrales de l'IHA (encéphalopathie et œdème cérébral). Dans un premier lieu, des études menées chez la souris hyperammonémique (Itzhak et al., 1995), ainsi que dans des modèles d'IHA chez la souris (Itzhak et al., 1995) ou (dans la présente étude) chez le rat (Figure 4, Article 2) ont démontré que dans diverses situations où l'on observe une induction de PTBR, la concentration cérébrale de pregnénolone, le précurseur des neurostéroïdes, augmente simultanément. L'activation de la voie de synthèse des neurostéroïdes se reflète également par des niveaux élevés de tétrahydroprogestérone (THP) et de tétrahydrodéoxycorticostérone (THDOC) lors de l'hyperammonémie ou de l'IHA causée par la thioacétamide chez la souris (Norenberg et al., 1997). L'augmentation de la synthèse des neurostéroïdes semble avoir un effet délétère, puisque l'inhibition de PTBR par l'antagoniste du site IBP réduit significativement la mortalité suite à l'administration d'une dose létale d'ammoniaque (Itzhak et Norenberg, 1994b). De plus, l'administration de THP ou de THDOC à des souris saines cause des symptômes très similaires à ceux caractérisant l'EH, soit la léthargie et l'ataxie progressant vers la perte du réflexe de redressement et le coma (Norenberg et al., 1997).

Les neurostéroïdes sont de puissants modulateurs de l'excitabilité neuronale, ce qui pourrait expliquer leur capacité à induire des symptômes apparentés à l'encéphalopathie, en particulier si l'on considère leur capacité à potentialiser la neurotransmission GABAergique. Par exemple, le THP et le THDOC sont les modulateurs allostériques du récepteur GABA_A les plus efficaces qui soient connus et ont par conséquent un effet dépresseur sur le SNC (Majewska et al., 1986; Norenberg et al., 1997). D'autre part, certains neurostéroïdes tels la forme sulfatée de la pregnénolone (PS) ainsi que le

déhydroépiandrostérone (DHEA) et sa forme sulfatée (DHEAS) ont au contraire un effet inhibiteur sur la fonction du récepteur GABA_A (Mellon et Griffin, 2002). D'autres systèmes de neurotransmission sont également modulés par les neurostéroïdes. Par exemple, le DHEA et le PS exercent tous deux un effet modulateur positif sur le récepteur glutamatergique NMDA, alors que l'activité des récepteurs AMPA et kainate est inhibée par le PS (Mellon et Griffin, 2002). Bref, les neurostéroïdes peuvent avoir divers effets sur la neurotransmission, bien qu'il semble que dans l'ensemble, un effet inhibiteur général de l'excitabilité neuronale prédomine lors de l'IHA.

Outre leurs effets sur la neurotransmission, certaines études suggèrent également une contribution possible de PTBR et des neurostéroïdes au gonflement des astrocytes causant l'œdème cérébral. En effet, dans une étude menée dans des cultures astrocytaires, le PK11195, un antagoniste spécifique de PTBR, inhibe significativement le gonflement des cellules causé par l'ammoniaque, alors que le Ro5-4864, un agoniste de PTBR, a l'effet contraire et potentialise le gonflement des astrocytes induit par l'ammoniaque (Norenberg et Bender, 1994). De plus, plusieurs neurostéroïdes tels le DHEAS, le THP, la PS ainsi que le THDOC peuvent soit inhiber, soit augmenter le gonflement des astrocytes causé par l'ammoniaque, selon la concentration utilisée (Bender et Norenberg, 1998). Il est cependant difficile de savoir avec précision la contribution réelle des neurostéroïdes à l'œdème cérébral, puisque leur concentration respective dans le cerveau lors de l'IHA n'est pas connue.

Enfin, il semble que PTBR joue également un rôle central dans les mécanismes responsables du stress oxydatif. Certains suggèrent entre autres que PTBR est l'un des éléments composant le pore de transition de perméabilité mitochondriale (Galiegue et al., 2003). Il a été démontré que l'exposition de cultures d'astrocytes à divers ligands de PTBR

induit la production de radicaux libres et que cet effet peut être bloqué par la cyclosporine A, un inhibiteur du MPT (Jayakumar et al., 2002). Dans le même ordre d'idée, l'exposition de cultures d'astrocytes à divers ligands de PTBR cause également une augmentation de la nitration des résidus tyrosine des protéines, une conséquence directe du stress oxydatif (Gorg et al., 2003). Bien que son implication dans les mécanismes responsables des complications cérébrales survenant à la suite de l'insuffisance hépatique soit incertaine, un intérêt grandissant est porté au rôle du stress oxydatif lors de l'IHA.

1.3 Le transporteur facilitatif du glucose GLUT1

1.3.1 Modification de l'expression de GLUT1 lors de l'insuffisance hépatique aiguë

Les résultats de l'article 3 démontrent une augmentation de l'expression du transporteur du glucose GLUT1 au niveau de l'ARNm (Figure 1, Article 3) ainsi que de la protéine (Figure 3 et 4, Article 3) dans le cortex de rats ayant une IHA causée par la dévascularisation hépatique. GLUT1 est non seulement exprimé par les astrocytes, mais également par les cellules endothéliales des capillaires sanguins qui constituent la BHE où il joue un rôle central dans le transport du glucose en provenance du sang vers le SNC. Il est intéressant de constater que tant la forme astrocytaire (45 kDa) que la forme endothéliale (55 kDa) de GLUT1 (qui diffèrent l'une de l'autre par leur degré de glycosylation) sont induites lors de l'IHA chez le rat (Figure 3, Article 3). D'autre part, notre étude suggère également que l'induction de GLUT1 contribue à une augmentation du transport du glucose vers le SNC lors des stades avancés de l'encéphalopathie causée par l'IHA (Tableau 2, Article 3), appuyant l'hypothèse selon laquelle l'IHA cause un dérangement du métabolisme énergétique cérébral.

Des études menées dans deux modèles différents d'IHA démontrent que la concentration cérébrale des phosphates à haute énergie tels l'ATP et la phosphocréatine demeure dans les valeurs normales chez les animaux ayant une IHA (Deutz et al., 1988a; Bates et al., 1989). Cependant, malgré l'absence apparente d'un déficit énergétique net, plusieurs études suggèrent la présence d'anomalies plus subtiles du métabolisme énergétique cérébral lors de l'IHA. Une récente étude de résonance magnétique nucléaire démontre en effet une déficience du métabolisme oxydatif du glucose, accompagnée d'une nette augmentation de la synthèse *de novo* du lactate à partir de [1-¹³C]glucose, lors de l'IHA causée par la dévascularisation hépatique chez le rat (Zwingmann et al., 2003). Ainsi, cette étude suggère que l'IHA s'accompagne au niveau du SNC d'un ralentissement du cycle de Krebs résultant en une augmentation compensatoire de la glycolyse, qui pourrait en partie expliquer le maintien des niveaux cérébraux d'ATP lors de l'IHA. En appui à cette hypothèse, de nombreuses études rapportent une augmentation de la concentration cérébrale de lactate dans différents modèles expérimentaux d'IHA (Bates et al., 1989; Bosman et al., 1990; Peeling et al., 1993; Nyberg et al., 1998), suggérant qu'il y a en effet une stimulation de la glycolyse dans le cerveau de ces animaux.

Si l'on considère les résultats des études mentionnées plus haut suggérant une inhibition partielle du métabolisme oxydatif et une stimulation compensatoire de la glycolyse dans le cerveau lors de l'IHA, il est raisonnable de penser que l'induction de GLUT1 que nous observons dans les cellules de la BHE permet d'augmenter l'apport du glucose au cerveau afin de maintenir les niveaux d'ATP constants grâce à la glycolyse. En effet, celle-ci nécessite une quantité supérieure de glucose puisqu'elle ne produit que deux molécules d'ATP par molécule de glucose, comparativement aux 36 molécules d'ATP produite par l'oxydation complète du glucose dans la mitochondrie.

D'autre part, il est intéressant de constater que l'IHA cause une augmentation de l'expression de la forme astrocytaire de GLUT1 (45 kDa), alors que l'expression du transporteur neuronal du glucose GLUT3 est inchangée (Figure 1, Article 3). De prime abord, ces résultats peuvent paraître surprenants puisque l'on considère généralement que l'activité neuronale est responsable de l'immense majorité de la demande énergétique cérébrale (Attwell et Laughlin, 2001). Ces résultats sont toutefois cohérents avec l'hypothèse de la navette du lactate (Pellerin et al., 1998; Pellerin et Magistretti, 2003) qui retient énormément d'attention depuis quelques années. Selon cette hypothèse, les astrocytes jouent un rôle central dans le contrôle du métabolisme énergétique cérébral en étant les principaux responsables de l'augmentation de l'utilisation du glucose en réponse à l'activation neuronale. Le lactate ainsi produit dans les astrocytes serait transporté vers les neurones où il serait entièrement oxydé par le cycle de Krebs suite à sa conversion en pyruvate, fournissant aux neurones l'énergie leur étant nécessaire. Ainsi, cette compartimentation (probablement partielle) de la glycolyse dans les astrocytes permettrait d'expliquer l'existence d'un lien étroit entre l'expression de GLUT1 et l'utilisation cérébrale locale du glucose (Zeller et al., 1997), alors qu'au contraire, l'expression de GLUT3 reflète mal l'utilisation cérébrale locale du glucose (Zeller et al., 1995).

1.3.2 Facteurs modifiant l'expression de GLUT1

L'expression de GLUT1 peut être modifiée par de nombreux facteurs. En premier lieu, nous avons observé dans la présente étude un effet inducteur de concentrations pathophysiologiques d'ammoniaque sur l'expression de GLUT1 dans des cultures primaires d'astrocytes (Figure 5a, Article 3), suggérant un rôle direct de l'ammoniaque dans la hausse de l'expression de GLUT1 dans le cortex de rats ayant une IHA. De façon

analogue à ce que l'on observe *in vivo*, l'induction de GLUT1 causée par l'ammoniaque se traduit par une augmentation de l'utilisation du glucose dans les astrocytes en culture (Article 3, Figure 5b).

En raison de son importance dans le transport du glucose à la BHE, il n'est pas surprenant de constater que l'expression de GLUT1 peut être modifiée en réponse à un changement important de la concentration circulante de glucose. Ainsi, les niveaux de GLUT1 à la BHE augmentent suite à l'hypoglycémie chronique (Kumagai et al., 1995; Simpson et al., 1999), alors que l'hyperglycémie chronique produit l'effet inverse et réduit l'expression de GLUT1 à la BHE (Pardridge et al., 1990; Duelli et al., 2000). L'induction de GLUT1 en réponse à l'hypoglycémie suggère que GLUT1 fait partie de la famille des « glucose-regulated proteins » (GRP) qui est composée d'un ensemble de protéines chaperonnes induites par l'hypoglycémie, mais également par plusieurs autres sources de stress cellulaire (Wertheimer et al., 1991; Lee, 2001). Contrairement à GLUT1, l'expression d'autres membres de cette famille de protéines (GRP-78 et GRP-94) est inchangée dans notre étude (Figure 2, Article 3), ce qui suggère que l'hypoglycémie ou le simple stress ne peuvent expliquer l'induction de GLUT1 observée dans le cerveau de rats suite à l'IHA.

Il a également été démontré que l'hyperosmolarité causée par le mannitol augmente l'expression de GLUT1 au niveau du messenger et de la protéine dans les cellules clone 9 (dérivées du foie) (Hwang et Ismail-Beigi, 2001) ainsi que dans les cellules musculaires L6 (Taha et al., 1997). Il est possible qu'un mécanisme similaire soit impliqué dans l'induction de GLUT1 dans notre modèle d'IHA puisqu'une étude récente démontre une augmentation importante de la somme des osmolytes organiques dans le cerveau chez ces animaux (Zwingmann et al., 2004). Des études complémentaires sont cependant nécessaires

puisque aucune étude ne s'est jusqu'à présent intéressée à l'effet de l'hyperosmolarité sur l'expression de GLUT1 dans les astrocytes.

D'autre part, l'hypoxie est un autre facteur capable de modifier l'expression de GLUT1. En effet, l'ischémie cérébrale cause une augmentation de l'expression de GLUT1 dans le cerveau d'animaux adultes (Urabe et al., 1996) ou immatures (Vannucci et al., 1996). Des études *in vitro* démontrent également une induction de GLUT1 dans les cellules en culture suite à l'ischémie (Bruckner et al., 1999; Boado et Pardridge, 2002). Notons toutefois que, mis à part certains cas extrêmes où l'augmentation de la pression intracrânienne est telle que la circulation sanguine cérébrale est compromise, l'hypoxie cérébrale n'est généralement pas observée lors de l'IHA (Larsen, 2002).

Enfin, il a été démontré que même en présence d'oxygène, l'inhibition de la phosphorylation oxydative par des inhibiteurs de la fonction mitochondriale cause une induction de l'expression de GLUT1 (Shetty et al., 1993; Becker et al., 1996). Il semble ainsi que l'hypoxie et l'inhibition de la phosphorylation oxydative exercent leur action sur l'expression de GLUT1 par des mécanismes indépendants (Ebert et al., 1995; Behrooz et Ismail-Beigi, 1997). Certaines données expérimentales suggèrent que l'hyperammoniémie entraîne une dysfonction de la phosphorylation oxydative (Kosenko et al., 1996; Qureshi et al., 1998). On ne peut donc exclure la possibilité d'un effet indirect de l'ammoniaque sur l'expression de GLUT1 suite à une inhibition de la chaîne respiratoire chez les animaux ayant une IHA de même que dans les cultures astrocytaires exposées à l'ammoniaque.

1.3.3 Conséquences d'une induction de l'expression de GLUT1

Chez l'humain, le syndrome de la déficience de GLUT1, causé par une mutation du gène de GLUT1, a de profonds effets sur la fonction du SNC et peut causer un retard

mental, la microcéphalie ainsi qu'une variété d'anomalies de la fonction motrice et du métabolisme énergétique cérébral (Pascual et al., 2004). Si les effets de la déficience de GLUT1 sont assez bien connus, on ne peut en dire autant des conséquences d'une augmentation de l'expression de GLUT1. Évidemment, l'effet premier de l'induction de GLUT1 dans les cellules en culture est l'augmentation du transport du glucose (Bruckner et al., 1999; Hwang et Ismail-Beigi, 2001) ce qui se traduit chez les animaux par une augmentation de la capture de glucose par le cerveau (Simpson et al., 1999) (Article 3, Tableau 2). Il semble toutefois que l'induction de GLUT1 puisse avoir d'autres effets sur le fonctionnement du SNC. La Figure 3.3 résume les principales conséquences possibles d'une induction de GLUT1 lors de l'IHA.

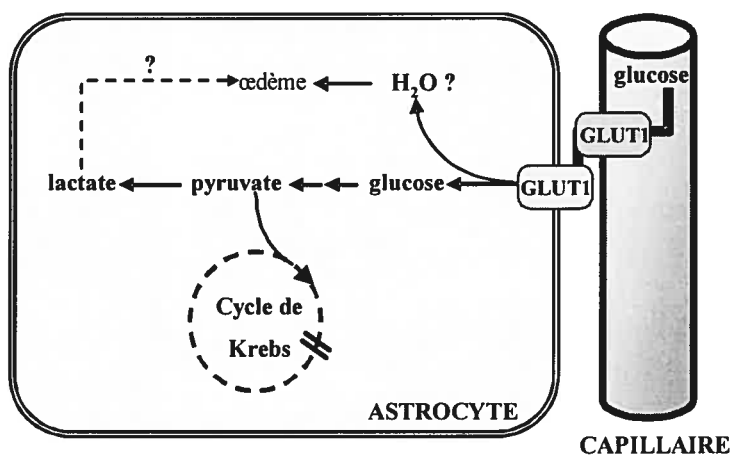


Figure 3.3 Schéma représentant les événements pouvant résulter d'une induction de GLUT1 lors de l'IHA causée par la dévascularisation hépatique. L'expression de GLUT1 est augmentée suite à un dérangement du métabolisme énergétique oxydatif afin de maintenir les niveaux d'ATP via l'activation de la glycolyse. Ce mécanisme contribue potentiellement à l'augmentation de la synthèse cérébrale de lactate observée dans ce modèle d'IHA. Les transporteurs du glucose peuvent également participer au transport de l'eau, suggérant un rôle de l'induction de GLUT1 dans l'apparition de l'œdème cérébral lors de l'IHA.

Dans un premier temps, il a été démontré que les transporteurs facilitatifs du glucose, dont GLUT1 fait partie, peuvent également servir de canal osmotique, même en l'absence de glucose (Fischbarg et al., 1990). Un rôle des transporteurs du glucose dans le

mouvement cellulaire de l'eau est entre autres illustré par le fait que des inhibiteurs des transporteurs facilitatifs du glucose causent une diminution de la perméabilité cellulaire à l'eau (Fischbarg et al., 1989; Loike et al., 1993). À la lumière de ces études, il apparaît possible que l'induction de GLUT1 favorise l'apparition de l'œdème cérébral lors de l'IHA. Une telle hypothèse serait en effet cohérente avec les études démontrant le gonflement cellulaire localisé surtout au niveau des astrocytes (Traber et al., 1987; Kato et al., 1989; Kato et al., 1992), mais également des cellules endothéliales (Kato et al., 1992) lors de l'IHA, soit les deux principaux types cellulaires exprimant GLUT1 dans le cerveau.

D'autre part, comme nous l'avons déjà mentionné, il est possible que l'inhibition du métabolisme oxydatif cérébral survenant lors de l'IHA soit à l'origine de l'induction de GLUT1, ayant pour effet de fournir plus de glucose au cerveau afin de soutenir la production d'ATP grâce à la glycolyse. Cela pourrait en effet expliquer l'accumulation de lactate fréquemment observée lors de l'IHA (Bosman et al., 1990; Peeling et al., 1993; Mans et al., 1994; Zwingmann et al., 2003). Il semble cependant que cette accumulation de lactate ait des effets délétères sur la fonction cérébrale.

Plusieurs études démontrent que l'accumulation cérébrale de lactate lors de l'IHA augmente progressivement en parallèle avec la détérioration des symptômes neurologiques (Therrien et al., 1991; Mans et al., 1994; Zwingmann et al., 2003) et est sélectivement normalisée chez les animaux protégés par l'hypothermie légère (Chatauret et al., 2003). De façon plus spécifique, la concentration cérébrale de lactate augmente en parallèle avec l'apparition des changements du tracé électro-encéphalographique caractérisant l'encéphalopathie et le coma dans un modèle expérimental d'IHA chez le rat (Deutz et al., 1988b). Il est intéressant de noter qu'on observe également une augmentation de la concentration cérébrale de lactate en relation avec le degré d'encéphalopathie chez des

patients ayant une insuffisance hépatique chronique (Yao et al., 1987). De plus, l'amélioration des symptômes de l'encéphalopathie chez ces patients s'accompagne d'une diminution de la concentration cérébrale de lactate (Yao et al., 1987).

Certaines études suggèrent également un rôle du lactate dans l'apparition de l'œdème cérébral associé à l'IHA. En effet, une étude menée dans un modèle d'IHA chez le chien démontre une augmentation progressive du niveau de lactate dans le cerveau de ces animaux en fonction de l'augmentation de la pression intracrânienne, avec une augmentation brusque du lactate survenant juste avant la mort cérébrale (Nyberg et al., 1998). De plus, Tofteng et al. (2002), dans une étude utilisant la microdialyse *in vivo* chez l'homme, sont parvenus à mesurer les niveaux extracellulaires de lactate simultanément à la pression intracrânienne chez des patients atteints d'IHA. Cette étude démontre que les élévations brusques de la pression intracrânienne sont toujours précédées d'une augmentation de la concentration extracellulaire de lactate, suggérant un rôle de l'accumulation de lactate dans le développement de l'œdème cérébral lors de l'IHA. Il a par ailleurs été démontré que le lactate cause un gonflement des astrocytes *in vitro* (Plesnila et al., 1999). L'induction de GLUT1 pourrait donc indirectement contribuer au développement de l'œdème cérébral en augmentant la disponibilité du glucose nécessaire pour la glycolyse, qui elle-même cause une accumulation de lactate.

2.4 Rôle de l'ammoniaque dans les changements de l'expression génique associés à l'IHA

L'expression génique est contrôlée par de très nombreux facteurs pouvant moduler chacune des étapes intervenant entre la transcription et la traduction. Dans le cas particulier de l'IHA, on constate que l'ammoniaque est un facteur central impliqué dans plusieurs des

changements d'expression rapportés. Cette conclusion découle entre autres de nombreuses études *in vitro* qui démontrent que l'exposition de cultures d'astrocytes à l'ammoniaque reproduit la plupart des changements d'expression astrocytaire observés dans divers modèles expérimentaux d'IHA. Le tableau 3.1 résume les modifications connues de l'expression génique causées par l'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations pathologiques d'ammoniaque.

Protéine	Altération	Référence
GFAP	↓ ARNm	(Norenberg et al., 1990)
	↓ protéine	(Neary et al., 1994)
Heme oxygénase 1	↑ ARNm	(Warskulat et al., 2002)
PTBR	↑ Sites de liaison	(Itzhak et Norenberg, 1994a)
Aquaporine 4	↑ protéine	(Rama Rao et al., 2003a)
GLAST	↓ ARNm	(Zhou et Norenberg, 1999)
	↓ protéine	(Chan et al., 2000)
GLUT1	↑ protéine	(Figure 5, Article 3)

Tableau 3.1 Changements d'expression causés par l'ammoniaque dans les cultures d'astrocytes

Les effets précis de l'ammoniaque sur les différentes étapes pouvant affecter l'expression d'un gène (transcription, stabilité de l'ARNm, traduction, etc.) sont très mal connus. Cependant, puisque l'ammoniaque exerce un effet sur l'expression d'un grand nombre de gènes sans lien apparent, il est raisonnable de penser que les mécanismes impliqués affectent des aspects généraux de l'expression. La présente section décrit quelques-uns des mécanismes par lesquels l'ammoniaque pourrait théoriquement moduler l'expression génique.

L'exposition de cultures d'astrocytes à l'ammoniaque cause une baisse de la concentration intracellulaire de calcium (Neary et al., 1990). Le calcium est un important second messenger pouvant exercer un contrôle sur de nombreuses fonctions cellulaires dont l'expression génique. La concentration intracellulaire de calcium peut en effet affecter la transcription (van Haasteren et al., 1999), la stabilité de l'ARNm (Ziegler et al., 1990; Bartlett et al., 1992; Klein et al., 1999), de même que la traduction (Brostrom et Brostrom, 2003). Il est donc possible que l'ammoniaque affecte un ou plusieurs de ces mécanismes à la suite d'une diminution de la concentration intracellulaire de calcium, avec pour effet une modification de l'expression génique des astrocytes.

L'ammoniaque cause également une acidification du pH intracellulaire dans les astrocytes en culture (Mellergard et Siesjo, 1991; Nagaraja et Brookes, 1998). Le pH peut jouer un rôle dans le contrôle de l'expression génique comme le démontre plusieurs études rapportant une augmentation de la stabilité de divers ARNm causée par une diminution du pH intracellulaire (Kaiser et al., 1992; Laterza et Curthoys, 2000; Labow et al., 2001; Karim et al., 2003). Ce mécanisme demeure assez peu connu et son importance dans les astrocytes reste à déterminer.

Certaines études suggèrent que les voies de signalisation de l'AMP cyclique (AMPc) sont altérées par l'ammoniaque. Il a en effet été démontré que l'ammoniaque diminue la production d'AMPc suite à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques dans les astrocytes en culture (Liskowsky et al., 1986). De plus, l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc (par exemple grâce au dibutyryl AMPc) atténue la toxicité causée par l'ammoniaque dans les astrocytes en culture (Gregorios et al., 1986). Il est possible que la baisse des niveaux d'AMPc diminue l'activité de la protéine kinase A

(PKA) qui elle-même est impliquée dans la phosphorylation de facteurs de transcription (tels CREB, CREM ou ATF-1), causant leur activation.

Enfin, bien que les mécanismes impliqués ne soient pas connus, il a été démontré que l'ammoniaque augmente la phosphorylation de plusieurs protéines (Neary et al., 1987; Schliess et al., 2002), parmi lesquelles on trouve Erk-1, Erk-2 et p38, trois membres de la famille des MAPK (« mitogen-activated protein kinase »). Erk-1 et Erk-2 phosphorylent des facteurs de transcription généralement impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire (Kohn et Pouyssegur, 2003), alors que la p38 MAPK fait partie d'une voie de signalisation pro-inflammatoire activée par le stress cellulaire (Dean et al., 2004).

2. Caractérisation neurobiologique d'un nouveau modèle d'IHA chez la souris

Les résultats de la présente étude appuient les données antérieures (Knecht et al., 1997; Margulies et al., 1999; Desjardins et al., 2001; Zwingmann et al., 2002) démontrant que des changements d'expression du SNC, plus particulièrement au niveau des astrocytes, peuvent affecter la fonction cérébrale et ainsi contribuer à l'apparition de l'œdème cérébral et de l'EH associés à l'IHA. L'identification des gènes affectés lors de l'IHA de même que l'élucidation des conséquences découlant de ces changements d'expression sont donc nécessaires à une meilleure compréhension des mécanismes pathophysiologiques responsables des complications neurologiques de l'IHA. Cependant, en raison de la nature multi-factorielle de l'IHA, il est difficile de cerner les répercussions de chacune des modifications de l'expression génique causées par l'IHA.

Les techniques de biologie moléculaire permettant de surexprimer ou, au contraire, d'inactiver l'expression de certains gènes chez des animaux expérimentaux (animaux transgéniques, « knock-outs ») constitue un outil de choix pour l'étude du rôle de gènes

précis dans diverses situations pathologiques. Bien qu'un premier knockout chez le rat ait récemment été décrit (Zan et al., 2003), la souris demeure l'espèce animale de choix pour le développement de d'animaux transgéniques. Malheureusement, l'utilisation d'animaux knock-outs dans le but de comprendre les conséquences des changements d'expression survenant lors de l'IHA est limitée par l'absence d'un modèle adéquat d'IHA chez la souris.

2.1 Limitations des modèles expérimentaux d'IHA chez la souris

En raison de sa petite taille, les techniques chirurgicales de dévascularisation ou d'ablation du foie sont pratiquement impossibles à réaliser chez la souris. D'autre part, l'utilisation de toxines hépatiques afin d'induire l'IHA chez la souris a jusqu'à maintenant donné des résultats décevants. L'acétaminophène cause une nécrose hépatique dépendante de la dose chez la souris (Newsome et al., 2000), mais est également associé à une toxicité extra-hépatique importante (Placke et al., 1987). De plus, ce modèle ne semble pas être adéquat pour l'étude des complications neurologiques de l'IHA puisqu'aucune étude ne rapporte la présence d'encéphalopathie ou d'œdème cérébral chez ces animaux.

La galactosamine est peu utilisée chez la souris afin d'induire l'IHA, probablement parce que la souris est plus résistante au dommage hépatique causé par cette toxine que le rat (Rahman et Hodgson, 2000), ce qui suppose l'administration de doses très élevées de galactosamine chez la souris, et accroît du même coup le risque de complications extra-hépatiques. De plus, tout comme l'acétaminophène, la galactosamine ne semble pas causer l'encéphalopathie hépatique et l'œdème cérébral chez la souris. L'incapacité à induire l'encéphalopathie suite à l'administration de galactosamine a également été rapportée chez

le rat (Mullen et al., 1988), contribuant à l'impopularité de la galactosamine comme moyen d'induire l'IHA chez les rongeurs.

Enfin, la thioacétamide est parfois utilisée afin d'induire l'encéphalopathie hépatique chez la souris, sans toutefois qu'aucune étude sérieuse de caractérisation n'ait été menée chez cette espèce. De plus, comme nous l'avons déjà mentionné, la thioacétamide n'est pas recommandée pour les études portant sur les effets de l'IHA sur le SNC en raison de sa neurotoxicité (Peeling et al., 1993).

2.2 Critères importants pour un modèle d'IHA destiné à des études de neurobiologie moléculaire

Les critères établis par Terblanche et Hickman (1991) (voir tableau 1.1, chapitre 1) définissent les caractéristiques d'un modèle idéal d'IHA et sont donc très utiles afin d'évaluer les modèles d'IHA disponibles. Cependant, la mise au point d'un modèle idéal d'IHA s'étant révélée particulièrement difficile, on s'entend maintenant pour dire qu'il est préférable de développer différents modèles d'IHA afin d'étudier les divers aspects de l'IHA plus adéquatement (Newsome et al., 2000; Filipponi et Mosca, 2001). Ainsi, dans le cas présent, où l'objectif est d'étudier les effets de changements d'expression dans le SNC à l'aide de souris modifiées génétiquement, la plupart des critères de Terblanche et Hickman (1991) s'appliquent toujours (reproductibilité, mort causée par l'insuffisance hépatique, présence d'une grande fenêtre thérapeutique et danger minimal pour le personnel). Toutefois, contrairement aux études visant à tester l'efficacité d'un traitement sur la survie des animaux, où la réversibilité est un critère essentiel, les études visant à comprendre les mécanismes impliqués dans l'apparition de l'encéphalopathie et de l'œdème cérébral ne nécessitent pas impérativement un modèle réversible (Filipponi et

Mosca, 2001). De plus, pour des raisons évidentes, le critère suggérant l'utilisation d'une espèce animale de grande taille ne peut être satisfait. Il est par contre important de mentionner que deux critères additionnels devraient être pris en compte pour les modèles destinés à l'étude du SNC lors de l'IHA, soit la présence de symptômes d'encéphalopathie (l'absence d'anesthésie générale est donc préférable afin de pouvoir évaluer l'état neurologique de l'animal) ainsi que la présence confirmée d'œdème cérébral.

2.3 Caractérisation du modèle d'IHA induite par l'azoxyméthane chez la souris

Une étude par Matkowskyj et al. (1999) décrit un nouveau modèle d'IHA induite par l'administration d'un ingrédient actif présent dans la noix de cycadalée, l'azoxyméthane (AOM), chez la souris. L'administration chronique de faibles doses d'AOM est fréquemment utilisée pour induire le cancer du colon chez des animaux expérimentaux (Takahashi et Wakabayashi, 2004), alors qu'à plus forte dose, l'AOM cause une dysfonction hépatique aiguë chez les rongeurs, les porcs, de même que chez l'humain (Laqueur et al., 1963; Wargovich et al., 1991; Matkowskyj et al., 1999; Doering et al., 2002). L'étude de Matkowskyj et al. (1999) démontre que chez la souris, l'AOM cause une toxicité hépatique augmentant en fonction de la dose et qui se traduit par des altérations biochimiques caractéristiques de l'IHA, soit l'hypoglycémie, l'augmentation de la concentration plasmatique d'alanine transaminase ainsi que l'augmentation de la concentration plasmatique d'ammoniaque. De plus, l'IHA causée par l'AOM est accompagnée de symptômes caractéristiques de l'EH soit la léthargie progressant vers l'ataxie, puis la perte du réflexe de redressement et enfin le coma (Matkowskyj et al., 1999). Bien que cette étude décrive un modèle prometteur d'IHA chez la souris, elle ne s'attarde que très peu à l'étude des modifications neurochimiques survenant dans ce

modèle. Nous avons donc poursuivi la caractérisation, particulièrement d'un point de vue neurobiologique, de ce modèle d'IHA induite par l'AOM chez la souris (Article 4).

Dans un premier lieu, les résultats de notre étude confirment les altérations biochimiques secondaires au dommage hépatique causé par l'AOM qui ont été rapportées précédemment (Matkowskyj et al., 1999). On observe en effet, chez les animaux au stade de coma, une augmentation marquée de la concentration plasmatique de l'ammoniaque (Figure 2A, Article 4), ainsi que des enzymes alanine transaminase (ALT) et aspartate transaminase (AST) (Figure 1F, Article 4), deux marqueurs fréquemment utilisés pour évaluer le dommage hépatique. D'autre part, l'analyse de la concentration plasmatique des différents acides aminés révèle un ensemble de changements caractéristiques de la dysfonction hépatique aiguë tant chez les animaux (Mans et al., 1994) que chez l'humain (Record et al., 1976). Ces changements consistent en une augmentation de la concentration plasmatique de la plupart des acides aminés, à l'exception du tryptophane et des acides aminés à chaîne ramifiée (valine, isoleucine et leucine) dont la concentration diminue (Table 1, article 4). Il en résulte une diminution de « l'index de Fisher », défini comme le ratio entre la somme des acides aminés aromatiques (AAA) et la somme des acides aminés à chaîne ramifiée (AACR) ($\text{index de Fisher} = \text{AAA}/\text{AACR}$). Cela confirme le développement de l'insuffisance hépatique suite à l'administration d'AOM puisque la diminution de l'index de Fisher est une observation typique de la dysfonction hépatique (Honda et al., 2004).

Notre étude démontre également la présence des complications neurologiques caractéristiques de l'IHA dans ce modèle. En effet, l'IHA induite par l'AOM entraîne l'apparition de symptômes de l'encéphalopathie se traduisant par la léthargie et l'ataxie, progressant vers la perte du réflexe de redressement et finalement, le coma. De plus,

l'encéphalopathie est accompagnée d'une augmentation du contenu en eau du cerveau (une mesure de l'œdème cérébral) au stade de coma chez les animaux ayant reçu de l'AOM (Figure 3, Article 4).

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'augmentation de la concentration cérébrale d'ammoniaque lors de l'IHA semble jouer un rôle central dans l'apparition de l'œdème cérébral et de l'EH associés à l'IHA. Conformément aux observations effectuées dans divers modèles animaux d'IHA (Swain et al., 1992; Mans et al., 1994; Rose et al., 2000), la concentration cérébrale d'ammoniaque est très élevée, près de 1 mM, chez les souris ayant une IHA causée par l'AOM (Figure 2B, Article 4). Comme c'est généralement le cas lors de l'IHA, on observe aussi une augmentation de la concentration cérébrale de glutamine, vraisemblablement une conséquence de la détoxification de l'ammoniaque par l'action de la GS dans le cerveau. La concentration cérébrale des autres acides aminés subit également des changements caractéristiques de l'IHA (Tableau 2, Article 4), parmi lesquels on trouve une diminution de la concentration totale de glutamate et une augmentation de la concentration de la tyrosine, de la phénylalanine, du tryptophane et de l'histidine, tous des acides aminés pouvant servir de précurseurs pour la synthèse de neurotransmetteurs. Un débalancement de la concentration cérébrale de ces acides aminés pourrait donc contribuer aux altérations des systèmes de neurotransmission noradrénergique, sérotoninergique et histaminergique qui ont été rapportées lors de l'IHA par de nombreuses études (Yurdaydin et al., 1996; Michalak et al., 1998; Michalak et al., 2001a; Lozeva-Thomas et al., 2004).

Un intérêt grandissant est porté aux effets protecteurs de l'hypothermie légère sur la fonction cérébrale lors de l'IHA. Nous avons donc entrepris d'évaluer les effets de l'hypothermie dans ce modèle d'IHA causée par l'AOM chez la souris dans le but de déterminer son utilité pour des études futures portant sur cette nouvelle approche

thérapeutique. De façon similaire à ce que l'on observe dans le modèle l'IHA causée par la dévascularisation hépatique chez le rat, l'hypothermie légère prévient l'apparition des symptômes de l'encéphalopathie ainsi que le développement de l'œdème cérébral chez les souris ayant une IHA causée par l'AOM (Figure 3, Article 4). On observe également une normalisation de la concentration cérébrale d'ammoniaque (Figure 2B, Article 4) ainsi qu'une amélioration du profil des concentrations cérébrales des acides aminés (Tableau 2, Article 4) chez ces animaux.

Cependant, contrairement à ce que l'on observe lors de la dévascularisation hépatique, il semble que l'effet protecteur de l'hypothermie dans le modèle d'IHA causée par l'AOM soit avant tout le résultat d'une diminution du dommage hépatique chez les animaux hypothermiques. En effet, l'atténuation de l'augmentation des niveaux plasmatiques d'AST et d'ALT (Figure 1F, Article 4), l'amélioration des modifications de la concentration plasmatique de la plupart des acides aminés (Tableau 1, Article 4) de même que la prévention complète de la hausse de la concentration plasmatique d'ammoniaque (Figure 2A, Article 4) sont trois observations suggérant une meilleure fonction hépatique chez les animaux hypothermiques en comparaison avec les animaux maintenus normothermiques. En effet, contrairement à la dévascularisation hépatique où le foie est chirurgiquement isolé de la circulation sanguine, l'induction de l'insuffisance hépatique par l'AOM dépend de son effet toxique sur les hépatocytes et il est donc logique qu'une baisse globale du métabolisme survenant lors de l'hypothermie légère ralentisse l'apparition de l'IHA chez ces animaux. Ce modèle d'IHA n'est donc pas idéal pour l'étude des effets protecteurs de l'hypothermie légère sur la fonction du SNC puisque les effets observés peuvent simplement être expliqués par l'atténuation du dommage hépatique. Cependant, les résultats de l'article 4 entraînent une nouvelle question intéressante : l'hypothermie légère

serait-elle utile en clinique afin de ralentir la progression de l'IHA en cas d'ingestion d'une toxine hépatique? Pour répondre à cette question, des études futures devront non seulement évaluer les effets de l'hypothermie sur le dommage hépatique, mais également son effet sur la régénération hépatique qui pourrait être compromise par un ralentissement du métabolisme.

Chez les animaux normothermiques, le modèle d'IHA induite par l'AOM satisfait la plupart des critères de Terblanche et Hickman (1991) définissant un modèle expérimental adéquat d'IHA. Ce modèle est en effet reproductible, potentiellement réversible, il cause une IHA fatale, présente une longue fenêtre thérapeutique et cause l'encéphalopathie hépatique et l'œdème cérébral. En contrepartie, les désavantages principaux de ce modèle sont les limitations techniques dues à la petite taille des souris ainsi que le danger potentiel causé par l'AOM pour le personnel de laboratoire.

CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS

1. On observe une baisse de l'expression de la GFAP, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine chez le rat ayant une IHA causée par la dévascularisation hépatique. Cette perte de la GFAP est apparente six heures après la dévascularisation hépatique et s'accroît progressivement aux stades de précoma et de coma, parallèlement au développement de l'œdème cérébral. Cette étude suggère qu'une modification de l'architecture cellulaire des astrocytes contribue au gonflement de ce type cellulaire, lui-même en partie responsable de l'œdème cérébral et de l'augmentation de la pression intracrânienne lors de l'IHA.
2. L'IHA cause une augmentation des niveaux de l'ARNm codant pour PTBR, entraînant une augmentation concomitante de la densité des sites de liaison spécifiques de PTBR. On observe également une augmentation de la concentration de la pregnénolone dans le cerveau, indiquant une stimulation de la voie de synthèse des neurostéroïdes suite à l'induction de PTBR lors de l'IHA.
3. L'hypothermie légère prévient la détérioration de la fonction neurologique ainsi que l'apparition de l'œdème cérébral dans le modèle de dévascularisation hépatique chez le rat. De plus, l'hypothermie atténue l'induction de PTBR, réduit l'augmentation du nombre de sites de liaison de PTBR et prévient l'augmentation de la concentration cérébrale de pregnénolone dans ce modèle d'IHA.

4. L'IHA entraîne une augmentation de l'expression cérébrale du transporteur du glucose GLUT1, exprimé par les astrocytes ainsi que par les cellules endothéliales de la BHE. L'induction de GLUT1 se traduit par une augmentation du transport du glucose de la périphérie vers le cerveau chez les animaux au stade de coma. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures démontrant des altérations du métabolisme énergétique cérébral lors de l'IHA. De plus, cette étude suggère, pour la première fois, un rôle des cellules endothéliales dans les mécanismes physiopathologiques responsables de l'EH et de l'œdème cérébral lors de l'IHA.
5. Contrairement à GLUT1, l'expression du transporteur neuronal du glucose GLUT3 reste quant à elle inchangée suite à la dévascularisation hépatique, ce qui est en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'IHA entraîne des altérations de la fonction gliale plutôt que neuronale.
6. L'exposition de cultures d'astrocytes à des niveaux d'ammoniaque similaires à ceux observés dans le cerveau lors de l'IHA cause également une augmentation de l'expression de GLUT1 accompagnée d'une augmentation de l'utilisation du glucose, suggérant un rôle de l'ammoniaque dans l'induction de GLUT1 lors de l'IHA.
7. L'administration d'azoxyméthane chez la souris cause une IHA caractérisée par l'augmentation de la concentration plasmatique des enzymes AST et ALT, l'hyperammoniémie, la modification des patrons de concentration plasmatique et cérébrale des acides aminés et l'œdème cérébral. L'hypothermie légère atténue le

dommage hépatique causé par l'azoxyméthane et par conséquent prévient les complications neurologiques associées à l'IHA chez les animaux normothermiques. Le développement d'un modèle approprié d'IHA chez la souris est nécessaire aux études de biologie moléculaire faisant appel à la technologie des animaux génétiquement modifiés afin d'acquérir une meilleure compréhension des conséquences des modifications de l'expression génique survenant lors de la dysfonction aiguë du foie.

CHAPITRE 5: SOMMAIRE

La dysfonction hépatique aiguë entraîne de nombreuses complications systémiques et neurologiques. D'un point de vue neuropathologique, l'IHA est associée à un gonflement cytotoxique astrocytaire pouvant entraîner l'hypertension intracrânienne et l'herniation du tronc cérébral, la cause principale de décès lors de l'IHA. L'effet toxique de l'ammoniaque sur le SNC, et en particulier sur les astrocytes, joue un rôle central parmi les mécanismes responsables de l'œdème cérébral survenant lors de l'IHA. Les résultats de la présente thèse démontrent que diverses modifications de l'expression de gènes codant pour des protéines astrocytaires surviennent lors de l'IHA et peuvent contribuer aux complications neurologiques associées à cet état. Le rôle de l'ammoniaque dans ces modifications de l'expression génique est appuyé par le fait que l'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations pathologiques d'ammoniaque récapitule les changements d'expression survenant lors de l'IHA causée par la dévascularisation hépatique chez le rat.

Bien que les protéines pour lesquelles nous avons démontré une modification de l'expression suite à l'IHA aient des fonctions différentes, chacune semble contribuer de façon distincte à l'apparition de l'œdème cérébral (Figure 3.4). Dans un premier temps, l'IHA cause une baisse de l'expression de la GFAP, une protéine structurale impliquée entre autres dans la régulation du volume intracellulaire. Une perte d'expression de la GFAP pourrait affecter l'intégrité architecturale des astrocytes et, par le fait même, favoriser l'apparition de l'œdème cérébral.

D'autre part, comme c'est aussi le cas pour plusieurs conditions caractérisées par l'hyperammoniémie, l'IHA s'accompagne d'une induction de PTBR, une protéine mitochondriale impliquée dans le transport du cholestérol nécessaire à la synthèse des neurostéroïdes. Nos résultats démontrent une augmentation de la concentration cérébrale de

la pregnénolone chez les rats ayant une IHA, suggérant l'activation de la voie de synthèse des neurostéroïdes associée à l'induction de PTBR chez ces animaux. Parmi les effets connus des neurostéroïdes, il a été démontré que cette classe de molécules peut affecter le gonflement des astrocytes induit par l'ammoniaque (soit positivement, soit négativement selon leur concentration). De plus amples études déterminant la concentration respective des différents neurostéroïdes seront donc nécessaires afin de mieux comprendre leur effet global lors de l'IHA.

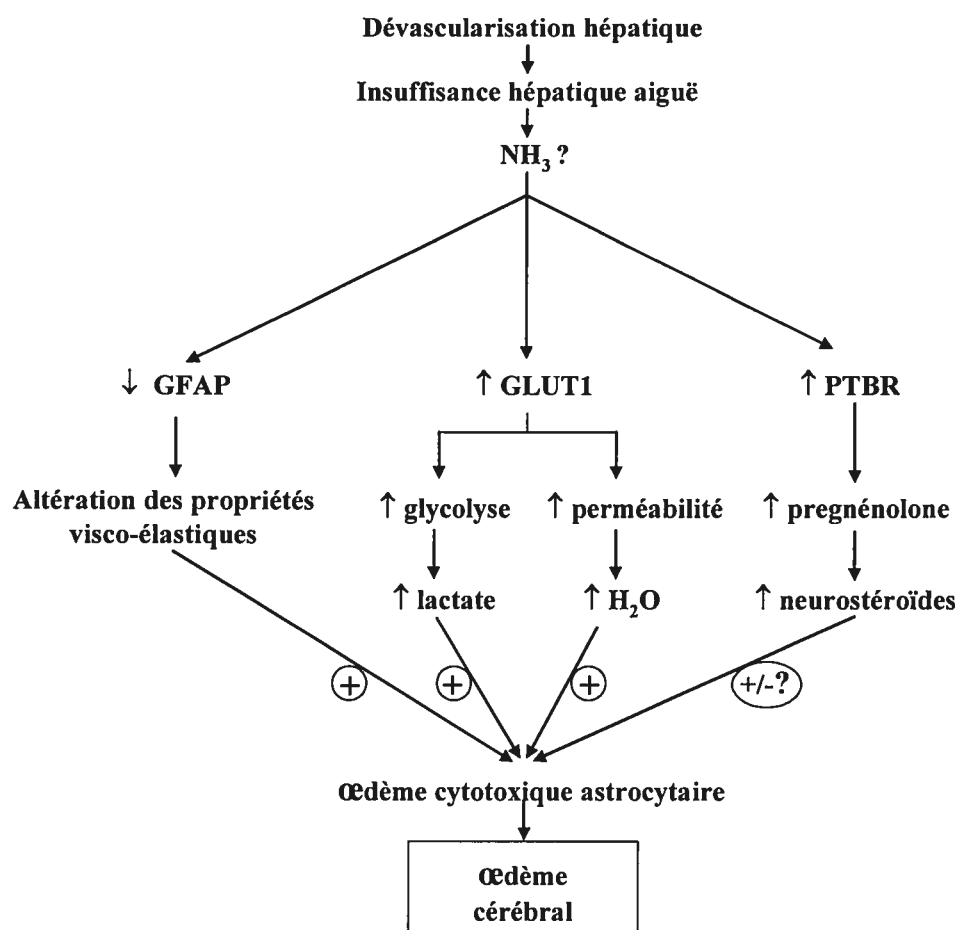


Figure 5.1 Rôle des altérations de l'expression génique dans l'apparition de l'œdème cérébral lors de l'IHA causée par la dévascularisation hépatique chez le rat

Enfin, on observe une augmentation de l'expression du transporteur du glucose GLUT1 dans les astrocytes et les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique de rats ayant une IHA causée par la dévascularisation hépatique. L'induction de GLUT1 s'accompagne d'une augmentation du transport du glucose vers le cerveau chez ces animaux. Ces résultats sont cohérents avec plusieurs études démontrant une activation de la glycolyse et/ou une augmentation de la production de lactate dans le cerveau lors de l'IHA. De plus en plus d'études suggèrent également un rôle de cette accumulation de lactate dans l'apparition de l'œdème cérébral lors de l'IHA. D'autre part, il a été démontré que les transporteurs du glucose peuvent servir de canal osmotique et augmenter la perméabilité membranaire. Il est donc possible que la hausse de l'expression de GLUT1 observée lors de l'IHA contribue à l'augmentation du contenu en eau du cerveau, plus particulièrement dans les cellules endothéliales et astrocytaires.

Les résultats de la présente étude appuient l'hypothèse selon laquelle le développement de l'œdème cérébral lors de l'IHA ne peut être expliqué par une cause unique, mais dépend plutôt d'un ensemble de facteurs agissant de concert pour causer le gonflement des astrocytes. Il va de soi que la contribution des modifications de l'expression génique au gonflement des astrocytes n'exclue pas l'existence d'autres mécanismes impliqués dans le développement de l'œdème cérébral lors de l'IHA, tels l'effet osmotique de l'accumulation de la glutamine ou l'effet de dérangements hémodynamiques (voir section 3.3, chapitre 1).

Bien que la présente étude ne se soit pas penchée en détail sur cette question, l'existence d'interactions entre les divers changements d'expression du système nerveux central observés lors de l'IHA ne peut être exclue. Par exemple, il a été démontré *in vitro* comme *in vivo* que les certains neurostéroïdes (i.e. pregnenolone, DHEA,

désoxycorticostérone, déshydro désoxycorticostérone) affectent l'expression de la GFAP (à la hausse ou à la baisse dépendant de l'âge, de la région et du modèle utilisé) (Melcangi et al., 1997; Shirayama et al., 2005). Il est donc possible qu'une augmentation de la production de neurostéroïdes suite à l'induction de PTBR affecte indirectement l'expression de la GFAP lors de l'IHA. D'autre part, des ligands spécifiques de PTBR induisent la production d'espèces oxygénées radicalaires dans des cultures primaires d'astrocytes et de neurones (Jayakumar et al., 2002). Or, les espèces oxygénées radicalaires causent une augmentation de l'activité de GLUT1 dans certaines lignées cellulaires (Prata et al., 2004; Fiorentini et al., 2004). Des études supplémentaires seraient toutefois nécessaires afin de vérifier ces hypothèses et l'existence de telles interactions dans le contexte de l'IHA reste pour le moment purement spéculative.

Le rôle des changements de l'expression génique dans le SNC lors de l'IHA commence à peine à être exploré. Des études futures seraient nécessaires afin de compléter « l'inventaire » des gènes dont l'expression est modifiée lors de l'IHA. Pour ce faire, l'utilisation de la technologie des puces à ADN (« gene chip microarray »), permettant d'évaluer l'expression de milliers de gènes à la fois, serait une approche efficace afin d'obtenir un portrait de l'expression génique du SNC lors de l'IHA. Les résultats obtenus grâce à cette technique doivent bien sûr être interprétés avec prudence et doivent être confirmés par d'autres techniques, mais permettent du moins d'orienter les efforts de recherche vers les gènes d'intérêt.

D'autre part, la caractérisation d'un modèle d'IHA causée par l'azoxyméthane chez la souris permettra l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés dans le but d'étudier les effets des changements de l'expression génique lors de l'IHA. Quelques exemples d'animaux « knock-outs » d'intérêt pour l'IHA qui sont présentement disponibles sont la

GFAP, l'aquaporine IV ou le transporteur du glutamate GLT-1. Une meilleure connaissance des conséquences découlant des modifications de l'expression génique du SNC survenant lors de l'IHA est nécessaire afin d'améliorer notre compréhension des complications neurologiques de l'IHA et permettre le développement de nouvelles avenues thérapeutiques destinées à améliorer le taux de survie des patients atteints d'IHA.

Références

- Adams, RH, Sato, K, Shimada, S, Tohyama, M, Puschel, AW, Betz, H, 1995. Gene structure and glial expression of the glycine transporter GlyT1 in embryonic and adult rodents. *J. Neurosci.* 15, 2524-2532.
- Adams, R, Foley, J, 2004. The neurological disorder associated with liver disease. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 32, 198-237.
- Aggarwal, S, Kramer, D, Yonas, H, Obrist, W, Kang, Y, Martin, M, Policare, R, 1994. Cerebral hemodynamic and metabolic changes in fulminant hepatic failure: a retrospective study. *Hepatology* 19, 80-87.
- Alho, H, Varga, V, Krueger, KE, 1994. Expression of mitochondrial benzodiazepine receptor and its putative endogenous ligand diazepam binding inhibitor in cultured primary astrocytes and C-6 cells: relation to cell growth. *Cell Growth Differ.* 5, 1005-1014.
- Arthur, FE, Shivers, RR, Bowman, PD, 1987. Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Brain Res.* 433, 155-159.
- Aschner, M, 1998. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. *Neurotoxicology* 19, 269-281.
- Attwell, D, Laughlin, SB, 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 21, 1133-1145.
- Azoulay, D, Astarcioglu, I, Astarcioglu, H, Lemoine, A, Majno, P, Bismuth, H, 1997. A new technique of one-stage total hepatectomy in the rat. *Surgery* 121, 219-222.

Bai, G, Rama Rao, KV, Murthy, CR, Panickar, KS, Jayakumar, AR, Norenberg, MD, 2001. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 66, 981-991.

Balasingam, V, Tejada-Berges, T, Wright, E, Bouckova, R, Yong, VW, 1994. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J. Neurosci.* 14, 846-856.

Ballabh, P, Braun, A, Nedergaard, M, 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 16, 1-13.

Bartlett, JD, Luethy, JD, Carlson, SG, Sollott, SJ, Holbrook, NJ, 1992. Calcium ionophore A23187 induces expression of the growth arrest and DNA damage inducible CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, *gadd153*. Ca^{2+} increases transcriptional activity and mRNA stability. *J. Biol. Chem.* 267, 20465-20470.

Basile, AS, Harrison, PM, Hughes, RD, Gu, ZQ, Pannell, L, McKinney, A et al., 1994. Relationship between plasma benzodiazepine receptor ligand concentrations and severity of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 19, 112-121.

Basile, AS, Hughes, RD, Harrison, PM, Murata, Y, Pannell, L, Jones, EA et al., 1991. Elevated brain concentrations of 1,4-benzodiazepines in fulminant hepatic failure. *N. Engl. J. Med.* 325, 473-478.

Basile, AS, Pannell, L, Jaouni, T, Gammal, SH, Fales, HM, Jones, EA, Skolnick, P, 1990. Brain concentrations of benzodiazepines are elevated in an animal model of hepatic encephalopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 5263-5267.

Basile, AS, Weissman, BA, Skolnick, P, 1987. Maximal electroshock increases the density of [^3H]Ro 5-4864 binding to mouse cerebral cortex. *Brain Res. Bull.* 19, 1-7.

Bates, TE, Williams, SR, Kauppinen, RA, Gadian, DG, 1989. Observation of cerebral metabolites in an animal model of acute liver failure in vivo: a ^1H and ^{31}P nuclear magnetic resonance study. *J. Neurochem* 53, 102-110.

Bauer, HC, Bauer, H, 2000. Neural induction of the blood-brain barrier: still an enigma. *Cell Mol. Neurobiol.* 20, 13-28.

Becker, M, Newman, S, Ismail-Beigi, F, 1996. Stimulation of GLUT1 glucose transporter expression in response to inhibition of oxidative phosphorylation: role of reduced sulfhydryl groups. *Mol. Cell Endocrinol.* 121, 165-170.

Behrooz, A, Ismail-Beigi, F, 1997. Dual control of glut1 glucose transporter gene expression by hypoxia and by inhibition of oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272, 5555-5562.

Bélanger, M, Aboucha S, Desjardins P, Butterworth RF 2003. Upregulation of peripheral-type (mitochondrial) benzodiazepine receptors in hyperammonemic syndromes: consequences for neuronal excitability. 31, pp. 983-998.

Bender, AS, Norenberg, MD, 1998. Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammonia-induced swelling in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 54, 673-680.

Benoist, S, Sarkis, R, Baudrimont, M, Delelo, R, Robert, A, Vaubourdolle, M et al., 2000. A reversible model of acute hepatic failure by temporary hepatic ischemia in the pig. *J. Surg. Res.* 88, 63-69.

Bernal, W, 2003. Changing patterns of causation and the use of transplantation in the United kingdom. *Semin. Liver Dis.* 23, 227-237.

Blei, AT, 2001. Pathophysiology of brain edema in fulminant hepatic failure, revisited. *Metab Brain Dis.* 16, 85-94.

Blei, AT, Olafsson, S, Therrien, G, Butterworth, RF, 1994. Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 19, 1437-1444.

Blitzer, BL, Waggoner, JG, Jones, EA, Gralnick, HR, Towne, D, Butler, J et al., 1978. A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology* 74, 664-671.

Boado, RJ, Pardridge, WM, 2002. Glucose deprivation and hypoxia increase the expression of the GLUT1 glucose transporter via a specific mRNA cis-acting regulatory element. *J. Neurochem* 80, 552-554.

Bodega, G, Suarez, I, Boyano, MC, Rubio, M, Villalba, RM, Arilla, E et al., 1993. High ammonia diet: its effect on the glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Neurochem Res.* 18, 971-975.

Bosman, DK, Deutz, NE, de Graaf, AA, vd Hulst, RW, van Eijk, HM, Bovee, WM et al., 1990. Changes in brain metabolism during hyperammonemia and acute liver failure: results of a comparative ¹H-NMR spectroscopy and biochemical investigation. *Hepatology* 12, 281-290.

Brostrom, MA, Brostrom, CO, 2003. Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability. *Cell Calcium* 34, 345-363.

Bruckner, BA, Ammini, CV, Otal, MP, Raizada, MK, Stacpoole, PW, 1999. Regulation of brain glucose transporters by glucose and oxygen deprivation. *Metabolism* 48, 422-431.

Brumback, RA, Lapham, LW, 1989. DNA synthesis in Alzheimer type II astrocytosis. The question of astrocytic proliferation and mitosis in experimentally induced hepatic encephalopathy. Arch. Neurol. 46, 845-848.

Brusilow, SW, 1986. hepatic encephalopathy. N. Engl. J. Med. 314, 786-letter.

Burkitt, H. G., Young, B., and Heath, J. W. Histologie fonctionnelle Wheater. 3e, 131. 1993. Paris, Arnette Blackwell.

Ref Type: Book, Whole

Butterworth, RF, 1998. Effects of hyperammonaemia on brain function. J. Inherit. Metab Dis. 21 Suppl 1, 6-20.

Butterworth, RF, 2002. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. Metab Brain Dis. 17, 221-227.

Butterworth, RF, 2003. Molecular neurobiology of acute liver failure. Semin. Liver Dis. 23, 251-258.

Caballero, ME, Berlanga, J, Ramirez, D, Lopez-Saura, P, Gozalez, R, Floyd, DN et al., 2001. Epidermal growth factor reduces multiorgan failure induced by thioacetamide. Gut 48, 34-40.

Canalese, J, Gimson, AE, Davis, C, Mellon, PJ, Davis, M, Williams, R, 1982. Controlled trial of dexamethasone and mannitol for the cerebral oedema of fulminant hepatic failure. Gut 23, 625-629.

Carpenedo, R, Mannaioni, G, Moroni, F, 1998. Oxindole, a sedative tryptophan metabolite, accumulates in blood and brain of rats with acute hepatic failure. J. Neurochem 70, 1998-2003.

Casellas, P, Galiegue, S, Basile, AS, 2002. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int.* 40, 475-486.

Castedo, M, Perfettini, JL, Kroemer, G, 2002. Mitochondrial apoptosis and the peripheral benzodiazepine receptor: a novel target for viral and pharmacological manipulation. *J. Exp. Med.* 196, 1121-1125.

Chan, H, Hazell, AS, Desjardins, P, Butterworth, RF, 2000. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int.* 37, 243-248.

Chatauret, N, Rose, C, Therrien, G, Butterworth, RF, 2001. Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure. *Metab Brain Dis.* 16, 95-102.

Chatauret, N, Zwingmann, C, Rose, C, Leibfritz, D, Butterworth, RF, 2003. Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: a H/C-nuclear magnetic resonance study. *Gastroenterology* 125, 815-824.

Chenard-Neu, MP, Boudjema, K, Bernuau, J, Degott, C, Belghiti, J, Cherqui, D et al., 1996. Auxiliary liver transplantation: regeneration of the native liver and outcome in 30 patients with fulminant hepatic failure--a multicenter European study. *Hepatology* 23, 1119-1127.

Cheng, VC, Lo, CM, Lau, GK, 2003. Current issues and treatment of fulminant hepatic failure including transplantation in Hong Kong and the Far East. *Semin. Liver Dis.* 23, 239-250.

Cholet, N, Pellerin, L, Magistretti, PJ, Hamel, E, 2002. Similar perisynaptic glial localization for the Na⁺,K⁺-ATPase alpha 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. *Cereb. Cortex* 12, 515-525.

Chung, C, Gottstein, J, Blei, AT, 2001. Indomethacin prevents the development of experimental ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 34, 249-254.

Clemmesen, JO, Hansen, BA, Larsen, FS, 1997. Indomethacin normalizes intracranial pressure in acute liver failure: a twenty-three-year-old woman treated with indomethacin. *Hepatology* 26, 1423-1425.

Clemmesen, JO, Kondrup, J, Ott, P, 2000. Splanchnic and leg exchange of amino acids and ammonia in acute liver failure. *Gastroenterology* 118, 1131-1139.

Clemmesen, JO, Larsen, FS, Kondrup, J, Hansen, BA, Ott, P, 1999. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29, 648-653.

Clifton, GL, Allen, S, Barrodale, P, Plenger, P, Berry, J, Koch, S et al., 1993. A phase II study of moderate hypothermia in severe brain injury. *J. Neurotrauma* 10, 263-271.

Cooper, AJ, McDonald, JM, Gelbard, AS, Gledhill, RF, Duffy, TE, 1979. The metabolic fate of ¹³N-labeled ammonia in rat brain. *J. Biol. Chem.* 254, 4982-4992.

Cooper, AJ, Plum, F, 1987. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev.* 67, 440-519.

Cooper, JL 1996. Role of the liver in amino acid metabolism. Zakim, D. and Boyer, T. D. (Ed.) *Hepatology*. third edition, pp. 563-601.

Copin, JC, Gasche, Y, 2003. [Morphology and physiology of the blood-brain barrier]. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 22, 202-214.

Cordoba, J, Alonso, J, Rovira, A, Jacas, C, Sanpedro, F, Castells, L et al., 2001. The development of low-grade cerebral edema in cirrhosis is supported by the evolution of (1)H-magnetic resonance abnormalities after liver transplantation. *J. Hepatol.* 35, 598-604.

Cordoba, J, Crespin, J, Gottstein, J, Blei, AT, 1999. Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology* 116, 686-693.

Daloz, P, Des, RC, Arnoux, R, Daloz, T, Smeesters, C, Brunengraber, H, 1990. One-stage hepatectomy in the dog. *J. Surg. Res.* 48, 33-37.

Danbolt, NC, 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1-105.

Day, JR, Laping, NJ, Lampert-Etchells, M, Brown, SA, O'Callaghan, JP, McNeill, TH, Finch, CE, 1993. Gonadal steroids regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the adult male rat hippocampus. *Neuroscience* 55, 435-443.

De Groot, GH, Reuvers, CB, Schalm, SW, Boks, AL, Terpstra, OT, Jeekel, H et al., 1987. A reproducible model of acute hepatic failure by transient ischemia in the pig. *J. Surg. Res.* 42, 92-100.

De Nicola, AF, Ferrini, M, Gonzalez, SL, Gonzalez Deniselle, MC, Grillo, CA, Piroli, G et al., 1998. Regulation of gene expression by corticoid hormones in the brain and spinal cord. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65, 253-272.

Dean, JL, Sully, G, Clark, AR, Saklatvala, J, 2004. The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal.* 16, 1113-1121.

Desjardins, P, Bandeira, P, Rao, VL, Butterworth, RF, 1999a. Portacaval anastomosis causes selective alterations of peripheral-type benzodiazepine receptor expression in rat brain and peripheral tissues. *Neurochem. Int.* 35, 293-299.

Desjardins, P, Belanger, M, Butterworth, RF, 2001. Alterations in expression of genes coding for key astrocytic proteins in acute liver failure. *J. Neurosci. Res.* 66, 967-971.

Desjardins, P, Rao, KV, Michalak, A, Rose, C, Butterworth, RF, 1999b. Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metab Brain Dis.* 14, 273-280.

Deutz, NE, Chamuleau, RA, de Graaf, AA, Bovee, WM, de Beer, R, 1988a. In vivo ³¹P NMR spectroscopy of the rat cerebral cortex during acute hepatic encephalopathy. *NMR Biomed.* 1, 101-106.

Deutz, NE, De Graaf AA, De Haan JG, Bovée WMMJ, Chamuleau RAMF 1988b. In vivo brain ¹H-NMR spectroscopy (1-NMRS) during acute hepatic encephalopathy (HE).

Soeters, P. B., Wilson, J. H. P., Meijer, A. J., and Holm, E. (Ed.) *Advances in Ammonia Metabolism and Hepatic Encephalopathy*. pp. 439-446.

Diemer, NH, Tonnesen, K, 1977. Glial changes in pigs with porto-caval anastomosis and temporary or total hepatic artery clamping. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [A]* 85, 721-730.

Dietrich, WD, Alonso, O, Busto, R, Globus, MY, Ginsberg, MD, 1994. Post-traumatic brain hypothermia reduces histopathological damage following concussive brain injury in the rat. *Acta Neuropathol. (Berl)* 87, 250-258.

Ding, M, Eliasson, C, Betsholtz, C, Hamberger, A, Pekny, M, 1998. Altered taurine release following hypotonic stress in astrocytes from mice deficient for GFAP and vimentin. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 62, 77-81.

Dixit, V, Chang, TM, 1990. Brain edema and the blood brain barrier in galactosamine-induced fulminant hepatic failure rats. An animal model for evaluation of liver support systems. *ASAIO Trans.* 36, 21-27.

Doering, CB, Josephson, CD, Craddock, HN, Lollar, P, 2002. Factor VIII expression in azoxymethane-induced murine fulminant hepatic failure. *Blood* 100, 143-147.

Dolman, CL, Clasen, RA, Dorovini-Zis, K, 1988. Severe cerebral damage in ornithine transcarbamylase deficiency. *Clin. Neuropathol.* 7, 10-15.

Donato, R, 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* 60, 540-551.

Dringen, R, Gutterer, JM, Hirrlinger, J, 2000. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* 267, 4912-4916.

Drugan, RC, Basile, AS, Crawley, JN, Paul, SM, Skolnick, P, 1986. Inescapable shock reduces [³H]Ro 5-4864 binding to "peripheral-type" benzodiazepine receptors in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 1673-1677.

Duchini, A, 1996. The role of central nervous system endothelial cell activation in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Med. Hypotheses* 46, 239-244.

Duelli, R, Maurer, MH, Staudt, R, Heiland, S, Duembgen, L, Kuschinsky, W, 2000. Increased cerebral glucose utilization and decreased glucose transporter Glut1 during chronic hyperglycemia in rat brain. *Brain Res.* 858, 338-347.

Duelli, R, Maurer, MH, Staudt, R, Sokoloff, L, Kuschinsky, W, 2001. Correlation between local glucose transporter densities and local 3-O-methylglucose transport in rat brain. *Neurosci. Lett.* 310, 101-104.

Durham, S, Yonas, H, Aggarwal, S, Darby, J, Kramer, D, 1995. Regional cerebral blood flow and CO₂ reactivity in fulminant hepatic failure. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 15, 329-335.

Ebert, BL, Firth, JD, Ratcliffe, PJ, 1995. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J. Biol. Chem.* 270, 29083-29089.

Eck, NV, 1877. Ligature of the portal vein. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 375-376.

Ede, RJ, Gimson, AE, Bihari, D, Williams, R, 1986. Controlled hyperventilation in the prevention of cerebral oedema in fulminant hepatic failure. *J. Hepatol.* 2, 43-51.

Faff-Michalak, L, Albrecht, J, 1991. Aspartate aminotransferase, malate dehydrogenase, and pyruvate carboxylase activities in rat cerebral synaptic and nonsynaptic mitochondria: effects of in vitro treatment with ammonia, hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 6, 187-197.

Farivar, M, Wands, JR, Isselbacher, KJ, Bucher, NL, 1976. Effect of insulin and glucagon on fulminant murine hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 295, 1517-1519.

Felipo, V, Butterworth, RF, 2002. Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol.* 67, 259-279.

Filipponi, F, Boggi, U, Meacci, L, Burchielli, S, Vistoli, F, Bellini, R et al., 1999. A new technique for total hepatectomy in the pig for testing liver support devices. *Surgery* 125, 448-455.

Filipponi, F, Mosca, F, 2001. Animal models of fulminant hepatic failure: need to test liver support devices. *Dig. Liver Dis.* 33, 607-613.

Fiorentini, D, Prata, C, Maraldi, T, Zambonin, L, Bonsi, L, Hakim, G, Landi, L, 2004. Contribution of reactive oxygen species to the regulation of Glut1 in two hemopoietic cell lines differing in cytokine sensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1402-1411.

Fischbarg, J, Kuang, KY, Hirsch, J, Lecuona, S, Rogozinski, L, Silverstein, SC, Loike, J, 1989. Evidence that the glucose transporter serves as a water channel in J774 macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 8397-8401.

Fischbarg, J, Kuang, KY, Vera, JC, Arant, S, Silverstein, SC, Loike, J, Rosen, OM, 1990. Glucose transporters serve as water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 3244-3247.

Fischer, JE, Rosen, HM, Ebeid, AM, James, JH, Keane, JM, Soeters, PB, 1976. The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. *Surgery* 80, 77-91.

Forbes, A, Alexander, GJ, O'Grady, JG, Keays, R, Gullan, R, Dawling, S, Williams, R, 1989. Thiopental infusion in the treatment of intracranial hypertension complicating fulminant hepatic failure. *Hepatology* 10, 306-310.

Fourneau, I, Pirenne, J, Roskams, T, Yap, SH, 2000. An improved model of acute liver failure based on transient ischemia of the liver. *Arch. Surg.* 135, 1183-1189.

Francavilla, A, Makowka, L, Polimeno, L, Barone, M, Demetris, J, Prelich, J et al., 1989. A dog model for acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 96, 470-478.

Fruhauf, NR, Oldhafer, KJ, Holtje, M, Kaiser, GM, Fruhauf, JH, Stavrou, GA et al., 2004. A bioartificial liver support system using primary hepatocytes: a preclinical study in a new porcine hepatectomy model. *Surgery* 136, 47-56.

Fujiwara, M, Watanabe, A, Shiota, T, Yamauchi, Y, Nakatsukasa, H, Takei, N et al., 1985. Hyperammonemia-induced cytotoxic brain edema under osmotic opening of blood-brain barrier in dogs. *Res. Exp. Med. (Berl)* 185, 425-427.

Galiegue, S, Tinel, N, Casellas, P, 2003. The peripheral benzodiazepine receptor: a promising therapeutic drug target. *Curr. Med. Chem.* 10, 1563-1572.

Gaub, J, Iversen, J, 1984. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 4, 902-904.

Gavish, M, Katz, Y, Bar-Ami, S, Weizman, R, 1992. Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Neurochem* 58, 1589-1601.

Gebhardt, R, Mecke, D, 1983. Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *EMBO J.* 2, 567-570.

Gill, RQ, Sterling, RK, 2001. Acute liver failure. *J. Clin. Gastroenterol.* 33, 191-198.

Gorg, B, Foster, N, Reinehr, R, Bidmon, HJ, Hongen, A, Haussinger, D, Schliess, F, 2003. Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Hepatology* 37, 334-342.

Gregorios, JB, Mozes, LW, Norenberg, LO, Norenberg, MD, 1986. Effect of cyclic AMP on ammonia-induced alterations in primary astrocyte cultures. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 45, 396-407.

Gruetter, R, 2003. Glycogen: the forgotten cerebral energy store. *J. Neurosci. Res.* 74, 179-183.

Gubernatis, G, Pichlmayr, R, Kemnitz, J, Gratz, K, 1991. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation (APOLT) for fulminant hepatic failure: first successful case report. *World J. Surg.* 15, 660-665.

Hanid, MA, Mackenzie, RL, Jenner, RE, Chase, RA, Mellon, PJ, Trewby, PN et al., 1979. Intracranial pressure in pigs with surgically induced acute liver failure. *Gastroenterology* 76, 123-131.

Harder, DR, Alkayed, NJ, Lange, AR, Gebremedhin, D, Roman, RJ, 1998. Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke* 29, 229-234.

Haussinger, D, 1986. Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular glutamine cycle. *Adv. Enzyme Regul.* 25, 159-180.

Haussinger, D, Kircheis, G, Fischer, R, Schliess, F, vom, DS, 2000. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J. Hepatol.* 32, 1035-1038.

Haussinger, D, Sies, H, Gerok, W, 1985. Functional hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism. The intercellular glutamine cycle. *J. Hepatol.* 1, 3-14.

Hazell, AS, Butterworth, RF, 1999. Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 99-112.

Hazell, AS, Desjardins, P, Butterworth, RF, 1999. Chronic exposure of rat primary astrocyte cultures to manganese results in increased binding sites for the 'peripheral-type' benzodiazepine receptor ligand 3H-PK 11195. *Neurosci. Lett.* 271, 5-8.

Hazell, AS, Normandin, L, Nguyen, B, Kennedy, G, 2003. Upregulation of 'peripheral-type' benzodiazepine receptors in the globus pallidus in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 349, 13-16.

Heijnen, BH, Straatsburg, IH, Gouma, DJ, van Gulik, TM, 2003. Decrease in core liver temperature with 10 degrees C by in situ hypothermic perfusion under total hepatic vascular exclusion reduces liver ischemia and reperfusion injury during partial hepatectomy in pigs. *Surgery* 134, 806-817.

Hertz, L, Dringen, R, Schousboe, A, Robinson, SR, 1999b. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* 57, 417-428.

Hertz, L, Dringen, R, Schousboe, A, Robinson, SR, 1999a. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* 57, 417-428.

Hickman, R, Dent, DM, Terblanche, J, 1974. The anhepatic model in a pig. *S. Afr. Med. J.* 48, 263-264.

Hindfelt, B, Siesjo, BK, 1971. Cerebral effects of acute ammonia intoxication. II. The effect upon energy metabolism. *Scand. J. Clin. Lab Invest* 28, 365-374.

- Honda, T, Fukuda, Y, Nakano, I, Katano, Y, Goto, H, Nagasaki, M et al., 2004. Effects of liver failure on branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in rat liver and muscle: comparison between acute and chronic liver failure. *J. Hepatol.* 40, 439-445.
- Hwang, DY, Ismail-Beigi, F, 2001. Stimulation of GLUT-1 glucose transporter expression in response to hyperosmolarity. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 281, C1365-C1372.
- Itzhak, Y, Norenberg, MD, 1994a. Ammonia-induced upregulation of peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes labeled with [3H]PK 11195. *Neurosci. Lett.* 177, 35-38.
- Itzhak, Y, Norenberg, MD, 1994b. Attenuation of ammonia toxicity in mice by PK 11195 and pregnenolone sulfate. *Neurosci. Lett.* 182, 251-254.
- Itzhak, Y, Roig-Cantisano, A, Dombro, RS, Norenberg, MD, 1995. Acute liver failure and hyperammonemia increase peripheral-type benzodiazepine receptor binding and pregnenolone synthesis in mouse brain. *Brain Res.* 705, 345-348.
- Jalan, R, 2003. Intracranial hypertension in acute liver failure: pathophysiological basis of rational management. *Semin. Liver Dis.* 23, 271-282.
- Jalan, R, Damink, SW, Deutz, NE, Lee, A, Hayes, PC, 1999. Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* 354, 1164-1168.
- Jalan, R, Davies, NA, Damink, SW, 2002a. Hypothermia for the management of intracranial hypertension in acute liver failure. *Metab Brain Dis.* 17, 437-444.
- Jalan, R, Olde Damink, SW, Deutz, NE, Hayes, PC, Lee, A, 2001. Restoration of cerebral blood flow autoregulation and reactivity to carbon dioxide in acute liver failure by moderate hypothermia. *Hepatology* 34, 50-54.

Jalan, R, Olde Damink, SW, Deutz, NE, Hayes, PC, Lee, A, 2004a. Moderate hypothermia in patients with acute liver failure and uncontrolled intracranial hypertension. *Gastroenterology* 127, 1338-1346.

Jalan, R, Pollok, A, Shah, SH, Madhavan, K, Simpson, KJ, 2002b. Liver derived pro-inflammatory cytokines may be important in producing intracranial hypertension in acute liver failure. *J. Hepatol.* 37, 536-538.

Jalan, R, Sen, S, Williams, R, 2004b. Prospects for extracorporeal liver support. *Gut* 53, 890-898.

Jayakumar, AR, Panickar, KS, Norenberg, MD, 2002. Effects on free radical generation by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor in cultured neural cells. *J. Neurochem* 83, 1226-1234.

Jayakumar, AR, Rama Rao, KV, Schousboe, A, Norenberg, MD, 2004. Glutamine-induced free radical production in cultured astrocytes. *Glia* 46, 296-301.

Johnson, AB, Brenner, M, 2003. Alexander's disease: clinical, pathologic, and genetic features. *J. Child Neurol.* 18, 625-632.

Kadota, Y, Inoue, K, Tokunaga, R, Taketani, S, 1996. Induction of peripheral-type benzodiazepine receptors in mouse brain following thioacetamide-induced acute liver failure. *Life Sci.* 58, 953-959.

Kaiser, S, Hwang, JJ, Smith, H, Banner, C, Welbourne, TC, Curthoys, NP, 1992. Effect of altered acid-base balance and of various agonists on levels of renal glutamate dehydrogenase mRNA. *Am. J. Physiol* 262, F507-F512.

- Kaneko, K, Kurumaji, A, Watanabe, A, Yamada, S, Toru, M, 1998. Changes in high K⁺-evoked serotonin release and serotonin 2A/2C receptor binding in the frontal cortex of rats with thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *J. Neural Transm.* 105, 13-30.
- Karim, Z, Attmane-Elakeb, A, Sibella, V, Bichara, M, 2003. Acid pH increases the stability of BSC1/NKCC2 mRNA in the medullary thick ascending limb. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2229-2236.
- Kato, A, Singh, S, McLeish, KR, Edwards, MJ, Lentsch, AB, 2002. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 282, G608-G616.
- Kato, M, Hughes, RD, Keays, RT, Williams, R, 1992. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 15, 1060-1066.
- Kato, M, Sugihara, J, Nakamura, T, Muto, Y, 1989. Electron microscopic study of the blood-brain barrier in rats with brain edema and encephalopathy due to acute hepatic failure. *Gastroenterol. Jpn.* 24, 135-142.
- Katunuma, N, Okada, M, Nishii, Y, 1966. Regulation of the urea cycle and TCA cycle by ammonia. *Adv. Enzyme Regul.* 4, 317-336.
- Kelly, JH, Koussayer, T, He, DE, Chong, MG, Shang, TA, Whisennand, HH, Sussman, NL, 1992. An improved model of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure in dogs. *Hepatology* 15, 329-335.
- Kemp, JA, Leeson, PD, 1993. The glycine site of the NMDA receptor--five years on. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 20-25.

Khandoga, A, Enders, G, Luchting, B, Axmann, S, Minor, T, Nilsson, U et al., 2003.

Impact of intraischemic temperature on oxidative stress during hepatic reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 901-909.

Kimelberg, HK, Kettenmann, H, 1990. Swelling-induced changes in electrophysiological properties of cultured astrocytes and oligodendrocytes. I. Effects on membrane potentials, input impedance and cell-cell coupling. *Brain Res.* 529, 255-261.

Kimura, T, Budka, H, 1986. Glial fibrillary acidic protein and S-100 protein in human hepatic encephalopathy: immunocytochemical demonstration of dissociation of two glia-associated proteins. *Acta Neuropathol. (Berl)* 70, 17-21.

Kircheis, G, Nilius, R, Held, C, Berndt, H, Buchner, M, Gortelmeyer, R et al., 1997.

Therapeutic efficacy of L-ornithine-L-aspartate infusions in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled, double-blind study. *Hepatology* 25, 1351-1360.

Klein, N, Curatola, AM, Schneider, RJ, 1999. Calcium-induced stabilization of AU-rich short-lived mRNAs is a common default response. *Gene Expr.* 7, 357-365.

Knecht, K, Michalak, A, Rose, C, Rothstein, JD, Butterworth, RF, 1997. Decreased

glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci. Lett.* 229, 201-203.

Kohno, M, Pouyssegur, J, 2003. Pharmacological inhibitors of the ERK signaling pathway: application as anticancer drugs. *Prog. Cell Cycle Res.* 5, 219-224.

Kosenko, E, Felipe, V, Montoliu, C, Grisolia, S, Kaminsky, Y, 1996. Effects of acute hyperammonemia in vivo on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria. *Metab Brain Dis.* 12, 69-82.

Kretzschmar, HA, DeArmond, SJ, Forno, LS, 1985. Measurement of GFAP in hepatic encephalopathy by ELISA and transblots. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44, 459-471.

Krieger, DW, Yenari, MA, 2004. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke* 35, 1482-1489.

Kumagai, AK, Kang, YS, Boado, RJ, Pardridge, WM, 1995. Upregulation of blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter protein and mRNA in experimental chronic hypoglycemia. *Diabetes* 44, 1399-1404.

Kvamme, E, Svenneby, G, Hertz, L, Schousboe, A, 1982. Properties of phosphate activated glutaminase in astrocytes cultured from mouse brain. *Neurochem Res.* 7, 761-770.

Labow, BI, Souba, WW, Abcouwer, SF, 2001. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism--glutaminase and glutamine synthetase. *J. Nutr.* 131, 2467S-2474S.

Lai, JC, Cooper, AJ, 1986. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J. Neurochem* 47, 1376-1386.

Laping, NJ, Morgan, TE, Nichols, NR, Rozovsky, I, Young-Chan, CS, Zarow, C, Finch, CE, 1994. Transforming growth factor-beta 1 induces neuronal and astrocyte genes: tubulin alpha 1, glial fibrillary acidic protein and clusterin. *Neuroscience* 58, 563-572.

Laqueur, GL, Mickelsen, O, Whiting, MG, Kurland, LT, 1963. Carcinogenic properties of nuts from *Cycas Circinalis* L. indigenous to Guam. *J. Natl. Cancer Inst.* 31, 919-951.

Larsen, FS, 2002. Cerebral blood flow in hyperammonemia: heterogeneity and starling forces in capillaries. *Metab Brain Dis.* 17, 229-235.

Larsen, FS, Adel, HB, Pott, F, Ejlersen, E, Secher, NH, Paulson, OB, Knudsen, GM, 1996. Dissociated cerebral vasoparalysis in acute liver failure. A hypothesis of gradual cerebral hyperaemia. *J. Hepatol.* 25, 145-151.

Larsen, FS, Ejlersen, E, Hansen, BA, Knudsen, GM, Tygstrup, N, Secher, NH, 1995. Functional loss of cerebral blood flow autoregulation in patients with fulminant hepatic failure. *J. Hepatol.* 23, 212-217.

Larsen, FS, Gottstein, J, Blei, AT, 2001. Cerebral hyperemia and nitric oxide synthase in rats with ammonia-induced brain edema. *J. Hepatol.* 34, 548-554.

Laterza, OF, Curthoys, NP, 2000. Specificity and functional analysis of the pH-responsive element within renal glutaminase mRNA. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 278, F970-F977.

Lavoie, J, Layrargues, GP, Butterworth, RF, 1990. Increased densities of peripheral-type benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology* 11, 874-878.

Lee, AS, 2001. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem. Sci.* 26, 504-510.

Lee, J, Lacomis, D, Comu, S, Jacobsohn, J, Kanal, E, 1998. Acquired hepatocerebral degeneration: MR and pathologic findings. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 19, 485-487.

Lee, WM, 2003. Acute liver failure in the United States. *Semin. Liver Dis.* 23, 217-226.

Leong, DK, Therrien, G, Swain, MS, Butterworth, RF, 1994. Densities of binding sites for the "peripheral-type" benzodiazepine receptor ligand 3H-PK11195 are increased in brain 24 hours following portacaval anastomosis. *Metab Brain Dis.* 9, 267-273.

Levison, S, Goldman J 1993. Astrocyte Origins. Murphy, S (Ed.) *Astrocytes Pharmacology and Function*. pp. 1-22.

Lima, FR, Trentin, AG, Rosenthal, D, Chagas, C, Moura, N, V, 1997. Thyroid hormone induces protein secretion and morphological changes in astroglial cells with an increase in expression of glial fibrillary acidic protein. *J. Endocrinol.* 154, 167-175.

Liskowsky, DR, Norenberg, LO, Norenberg, MD, 1986. Effect of ammonia on cyclic AMP production in primary astrocyte cultures. *Brain Res.* 386, 386-388.

Lockwood, AH, McDonald, JM, Reiman, RE, Gelbard, AS, Laughlin, JS, Duffy, TE, Plum, F, 1979. The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J. Clin. Invest* 63, 449-460.

Loike, JD, Cao, L, Kuang, K, Vera, JC, Silverstein, SC, Fischbarg, J, 1993. Role of facilitative glucose transporters in diffusional water permeability through J774 cells. *J. Gen. Physiol* 102, 897-906.

Lozeva-Thomas, V, Ahonen, P, Chatauret, N, Tuomisto, L, Butterworth, RF, 2004. Brain histamine in experimental acute liver failure: effects of L-histidine loading. *Inflamm. Res.* 53 Suppl 1, S55-S56.

Magistretti, PJ, Pellerin, L, 1999. Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci.* 14, 177-182.

Magistretti, P, Sorg O, Martin J-L 1993. Regulation of glycogen metabolism in astrocytes: physiological, pharmacological, and pathological aspects. Murphy, S (Ed.) *Astrocytes Pharmacology and Function*. pp. 243-265.

Majewska, MD, Harrison, NL, Schwartz, RD, Barker, JL, Paul, SM, 1986. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232, 1004-1007.

Mannaioni, G, Carpenedo, R, Corradetti, R, Carla, V, Venturini, I, Baraldi, M et al., 1999. Tryptophan metabolism and hepatic encephalopathy. Studies on the sedative properties of oxindole. *Adv. Exp. Med. Biol.* 467, 155-167.

Mans, AM, DeJoseph, MR, Hawkins, RA, 1994. Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J. Neurochem.* 63, 1829-1838.

Margulies, Thompson RC, and Demetriou AA, 1999. Aquaporin-4 water channel is upregulated in the brain in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 30, 395A (Abstract)

Marion, DW, Penrod, LE, Kelsey, SF, Obrist, WD, Kochanek, PM, Palmer, AM et al., 1997. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N. Engl. J. Med.* 336, 540-546.

Matkowskyj, KA, Marrero, JA, Carroll, RE, Danilkovich, AV, Green, RM, Benya, RV, 1999. Azoxymethane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model. *Am. J. Physiol* 277, G455-G462.

Melcangi, RC, Magnaghi, V, Cavarretta, I, Riva, MA, Martini, L, 1997. Corticosteroid effects on gene expression of myelin basic protein in oligodendrocytes and of glial fibrillary acidic protein in type 1 astrocytes. *J. Neuroendocrinol.* 9, 729-733.

Møllergaard, PE, Siesjö, BK, 1991. Astrocytes fail to regulate intracellular pH at moderately reduced extracellular pH. *Neuroreport* 2, 695-698.

Mellon, SH, Griffin, LD, 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. Trends Endocrinol. Metab 13, 35-43.

Michalak, A, Butterworth, RF, 1997. Selective loss of binding sites for the glutamate receptor ligands [3H]kainate and (S)-[3H]5-fluorowillardiine in the brains of rats with acute liver failure. Hepatology 25, 631-635.

Michalak, A, Chatauret, N, Butterworth, RF, 2001a. Evidence for a serotonin transporter deficit in experimental acute liver failure. Neurochem Int. 38, 163-168.

Michalak, A, Rose, C, Butterworth, J, Butterworth, RF, 1996. Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. Hepatology 24, 908-913.

Michalak, A, Rose, C, Butterworth, RF, 2001b. Loss of noradrenaline transporter sites in frontal cortex of rats with acute (ischemic) liver failure. Neurochem Int. 38, 25-30.

Michalak, A, Rose, C, Buu, PN, Butterworth, RF, 1998. Evidence for altered central noradrenergic function in experimental acute liver failure in the rat. Hepatology 27, 362-368.

Miyazawa, N, Diksic, M, Yamamoto, Y, 1995. Chronological study of peripheral benzodiazepine binding sites in the rat brain stab wounds using [3H] PK-11195 as a marker for gliosis. Acta Neurochir. (Wien.) 137, 207-216.

Mullen, KD, Schafer DF, Cuchi P, Rossle M, Maynard JF, Jones EA 1988. Evaluation of the suitability of galactosamine-induced fulminant hepatic failure as a model of hepatic encephalopathy in the rat and the rabbit. Soeters, P. B. and al. (Ed.) Advances in Ammonia Metabolism and Hepatic Encephalopathy. pp. 205-211.

Nagano, K, Gelman, S, Bradley, EL, Jr., Parks, D, 1990. Hypothermia, hepatic oxygen supply-demand, and ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am. J. Physiol* 258, G910-G918.

Nagaraja, TN, Brookes, N, 1998. Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am. J. Physiol* 274, C883-C891.

Nagelhus, EA, Mathiisen, TM, Ottersen, OP, 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129, 905-913.

Nawashiro, H, Messing, A, Azzam, N, Brenner, M, 1998. Mice lacking GFAP are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury. *Neuroreport* 9, 1691-1696.

Neary, JT, Norenberg, LO, Gutierrez, MP, Norenberg, MD, 1987. Hyperammonemia causes altered protein phosphorylation in astrocytes. *Brain Res.* 437, 161-164.

Neary, JT, Whittemore, SR, Zhu, Q, Norenberg, MD, 1994. Destabilization of glial fibrillary acidic protein mRNA in astrocytes by ammonia and protection by extracellular ATP. *J. Neurochem* 63, 2021-2027.

Neary, JT, Woodson, C, Blicharska, J, Norenberg, LO, Norenberg, MD, 1990. Effect of ammonia on calcium homeostasis in primary astrocyte cultures. *Brain Res.* 524, 231-235.

Newsome, PN, Plevris, JN, Nelson, LJ, Hayes, PC, 2000. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl.* 6, 21-31.

Norenberg, MD, 1977. A light and electron microscopic study of experimental portal-systemic (ammonia) encephalopathy. Progression and reversal of the disorder. *Lab Invest* 36, 618-627.

Norenberg, MD, Baker, L, Norenberg, LO, Blicharska, J, Bruce-Gregorios, JH, Neary, JT, 1991. Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem Res.* 16, 833-836.

Norenberg, MD, Bender, AS, 1994. Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines. *Acta Neurochir. Suppl (Wien.)* 60, 24-27.

Norenberg, MD, Itzhak, Y, Bender, AS, 1997. The peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in hepatic encephalopathy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 420, 95-111.

Norenberg, MD, Martinez-Hernandez, A, 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161, 303-310.

Norenberg, MD, Neary, JT, Norenberg, LO, McCarthy, M, 1990. Ammonia induced decrease in glial fibrillary acidic protein in cultured astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49, 399-405.

Norenberg, M, 1981. The astrocyte in liver disease. *Adv. Cell. Neurobiol.* 2, 303-352.

Normandin, L, Hazell, AS, 2002. Manganese neurotoxicity: an update of pathophysiologic mechanisms. *Metab Brain Dis.* 17, 375-387.

Novas, ML, Medina, JH, Calvo, D, De Robertis, E, 1987. Increase of peripheral type benzodiazepine binding sites in kidney and olfactory bulb in acutely stressed rats. *Eur. J. Pharmacol.* 135, 243-246.

Nyberg, SL, Cerra, FB, Gruetter, R, 1998. Brain lactate by magnetic resonance spectroscopy during fulminant hepatic failure in the dog. *Liver Transpl. Surg.* 4, 158-165.

Nyberg, SL, Mann, HJ, Hu, MY, Payne, WD, Hu, WS, Cerra, FB, Remmel, RP, 1996. Extrahepatic metabolism of 4-methylumbelliferone and lidocaine in the anhepatic rabbit. *Drug Metab Dispos.* 24, 643-648.

O'Callaghan, JP, Brinton, RE, McEwen, BS, 1989. Glucocorticoids regulate the concentration of glial fibrillary acidic protein throughout the brain. *Brain Res.* 494, 159-161.

Oh, YJ, Markelonis, GJ, Oh, TH, 1993. Effects of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha on the expression of glial fibrillary acidic protein and transferrin in cultured astrocytes. *Glia* 8, 77-86.

Okun, F, Weizman, R, Katz, Y, Bomzon, A, Youdim, MB, Gavish, M, 1988. Increase in central and peripheral benzodiazepine receptors following surgery. *Brain Res.* 458, 31-36.

Olafsson, S, Gottstein, J, Blei, AT, 1995. Brain edema and intracranial hypertension in rats after total hepatectomy. *Gastroenterology* 108, 1097-1103.

Olasmaa, M, Rothstein, JD, Guidotti, A, Weber, RJ, Paul, SM, Spector, S et al., 1990. Endogenous benzodiazepine receptor ligands in human and animal hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.* 55, 2015-2023.

Olde Damink, SW, Deutz, NE, Dejong, CH, Soeters, PB, Jalan, R, 2002. Interorgan ammonia metabolism in liver failure. *Neurochem Int.* 41, 177-188.

Ostapowicz, G, Fontana, RJ, Schiodt, FV, Larson, A, Davern, TJ, Han, SH et al., 2002. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann. Intern. Med.* 137, 947-954.

Panis, Y, McMullan, DM, Emond, JC, 1997. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 121, 142-149.

Papadopoulos, V, Widmaier, EP, Amri, H, Zilz, A, Li, H, Culty, M et al., 1998. In vivo studies on the role of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in steroidogenesis. *Endocr. Res.* 24, 479-487.

Pardridge, WM, Triguero, D, Farrell, CR, 1990. Downregulation of blood-brain barrier glucose transporter in experimental diabetes. *Diabetes* 39, 1040-1044.

Pascual, JM, Wang, D, Lecumberri, B, Yang, H, Mao, X, Yang, R, De Vivo, DC, 2004. GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases. *Eur. J. Endocrinol.* 150, 627-633.

Patzner, JF, Block, GD, Khanna, A, Yin, WY, Molmenti, E, Gerber, D et al., 2002. D-galactosamine based canine acute liver failure model. *Hepatobiliary. Pancreat. Dis. Int.* 1, 354-367.

Peeling, J, Shoemaker, L, Gauthier, T, Benarroch, A, Sutherland, GR, Minuk, GY, 1993. Cerebral metabolic and histological effects of thioacetamide-induced liver failure. *Am. J. Physiol* 265, G572-G578.

Peignoux, M, Bernuau, J, Benhamou, JP, 1982. Total hepatectomy and hepatic vascular exclusion in the rat: a comparison, with special reference to the influence of body temperature. *Clin. Sci. (Lond)* 62, 273-277.

Pekny, M, 2001. Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. *Prog. Brain Res.* 132, 23-30.

- Pekny, M, Eliasson, C, Siushansian, R, Ding, M, Dixon, SJ, Pekna, M et al., 1999. The impact of genetic removal of GFAP and/or vimentin on glutamine levels and transport of glucose and ascorbate in astrocytes. *Neurochem Res.* 24, 1357-1362.
- Pellerin, L, Magistretti, PJ, 1997. Glutamate uptake stimulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain. *J. Neurochem.* 69, 2132-2137.
- Pellerin, L, Magistretti, PJ, 2003. Food for thought: challenging the dogmas. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 23, 1282-1286.
- Pellerin, L, Pellegrini, G, Bittar, PG, Charnay, Y, Bouras, C, Martin, JL et al., 1998. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev. Neurosci.* 20, 291-299.
- Placke, ME, Wyand, DS, Cohen, SD, 1987. Extrahepatic lesions induced by acetaminophen in the mouse. *Toxicol. Pathol.* 15, 381-387.
- Plesnila, N, Haberstok, J, Peters, J, Kolbl, I, Baethmann, A, Staub, F, 1999. Effect of lactacidosis on cell volume and intracellular pH of astrocytes. *J. Neurotrauma* 16, 831-841.
- Prata, C, Maraldi, T, Zamboni, L, Fiorentini, D, Hakim, G, Landi, L, 2004. ROS production and Glut1 activity in two human megakaryocytic cell lines. *Biofactors* 20, 223-233.
- Prieto, JM, Fernandez, F, Alvarez, V, Espi, A, Garcia Marin, JF, Alvarez, M et al., 2000. Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Res. Vet. Sci.* 68, 181-187.

Probst, A, Cortes, R, Palacios, JM, 1986. The distribution of glycine receptors in the human brain. A light microscopic autoradiographic study using [3H]strychnine. *Neuroscience* 17, 11-35.

Qureshi, K, Rao, KV, Qureshi, IA, 1998. Differential inhibition by hyperammonemia of the electron transport chain enzymes in synaptosomes and non-synaptic mitochondria in ornithine transcarbamylase-deficient spf-mice: restoration by acetyl-L-carnitine. *Neurochem Res.* 23, 855-861.

Rahman, T, Hodgson, H, 2001. Clinical management of acute hepatic failure. *Intensive Care Med.* 27, 467-476.

Rahman, TM, Hodgson, HJ, 2000. Animal models of acute hepatic failure. *Int. J. Exp. Pathol.* 81, 145-157.

Rahman, TM, Selden, AC, Hodgson, HJ, 2002. A novel model of acetaminophen-induced acute hepatic failure in rabbits. *J. Surg. Res.* 106, 264-272.

Raine, CS 1999. Neurocellular Anatomy. Siegel G.J. (Ed.) *Basic Neurochemistry*. 6th, pp. 3-30.

Rama Rao, KV, Chen, M, Simard, JM, Norenberg, MD, 2003a. Increased aquaporin-4 expression in ammonia-treated cultured astrocytes. *Neuroreport* 14, 2379-2382.

Rama Rao, KV, Jayakumar, AR, Norenberg, MD, 2003b. Induction of the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes by glutamine. *Neurochem Int.* 43, 517-523.

Rao, VL, Audet, R, Therrien, G, Butterworth, RF, 1994. Tissue-specific alterations of binding sites for peripheral-type benzodiazepine receptor ligand [3H]PK11195 in rats following portacaval anastomosis. *Dig. Dis. Sci.* 39, 1055-1063.

Rao, VL, Murthy, CR, 1992. Hyperammonemic alterations in the metabolism of glutamate and aspartate in rat cerebellar astrocytes. *Neurosci. Lett.* 138, 107-110.

Rao, VL, Qureshi, IA, Butterworth, RF, 1993. Increased densities of binding sites for the peripheral-type benzodiazepine receptor ligand [3H]PK 11195 in congenital ornithine transcarbamylase-deficient sparse fur mouse. *Pediatr. Res.* 34, 777-780.

Ratnakumari, L, Murthy, CR, 1989. Activities of pyruvate dehydrogenase, enzymes of citric acid cycle, and aminotransferases in the subcellular fractions of cerebral cortex in normal and hyperammonemic rats. *Neurochem Res.* 14, 221-228.

Ratnakumari, L, Murthy, CR, 1993. Response of rat cerebral glycolytic enzymes to hyperammonemic states. *Neurosci. Lett.* 161, 37-40.

Record, CO, Buxton, B, Chase, RA, Curzon, G, Murray-Lyon, IM, Williams, R, 1976. Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy. *Eur. J. Clin. Invest* 6, 387-394.

Richardson, D, Bellamy, M, 2002. Intracranial hypertension in acute liver failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17, 23-27.

Ringe, B, Lubbe, N, Kuse, E, Frei, U, Pichlmayr, R, 1993. Total hepatectomy and liver transplantation as two-stage procedure. *Ann. Surg.* 218, 3-9.

Rodnight, R, Goncalves, CA, Wofchuk, ST, Leal, R, 1997. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 325-338.

Roger, V, Balladur, P, Honiger, J, Delelo, R, Baudrimont, M, Robert, A et al., 1996. [A good model of acute hepatic failure: 95% hepatectomy. Treatment by transplantation of hepatocytes]. *Chirurgie* 121, 470-473.

Rose, C, Butterworth, RF, Zayed, J, Normandin, L, Todd, K, Michalak, A et al., 1999a. Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology* 117, 640-644.

Rose, C, Michalak, A, Pannunzio, M, Chatauret, N, Rambaldi, A, Butterworth, RF, 2000. Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology* 31, 872-877.

Rose, C, Michalak, A, Rao, KV, Quack, G, Kircheis, G, Butterworth, RF, 1999b. L-ornithine-L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure. *Hepatology* 30, 636-640.

Rovira, A, Grive, E, Pedraza, S, Rovira, A, Alonso, J, 2001. Magnetization transfer ratio values and proton MR spectroscopy of normal-appearing cerebral white matter in patients with liver cirrhosis. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 22, 1137-1142.

Rozga, J, Jeppsson, B, Bengmark, S, Demetriou, AA, 1992. A simple two-stage technique of total hepatectomy in the rat. *J. Surg. Res.* 52, 46-49.

Rozga, J, Podesta, L, LePage, E, Hoffman, A, Morsiani, E, Sher, L et al., 1993. Control of cerebral oedema by total hepatectomy and extracorporeal liver support in fulminant hepatic failure. *Lancet* 342, 898-899.

Rubin, LL, Hall, DE, Porter, S, Barbu, K, Cannon, C, Horner, HC et al., 1991. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 115, 1725-1735.

Sattler, R, Tymianski, M, 2001. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol. Neurobiol.* 24, 107-129.

Schliess, F, Foster, N, Gorg, B, Reinehr, R, Haussinger, D, 2004. Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia* 47, 21-29.

Schliess, F, Gorg, B, Fischer, R, Desjardins, P, Bidmon, HJ, Herrmann, A et al., 2002. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J.* 16, 739-741.

Schneider, GH, Baethmann, A, Kempfski, O, 1992. Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 70 Suppl, S334-S343.

Schousboe, A, Hertz, L, Svenneby, G, Kvamme, E, 1979. Phosphate activated glutaminase activity and glutamine uptake in primary cultures of astrocytes. *J. Neurochem* 32, 943-950.

Schousboe, A, Waagepetersen H.S. 2004. Role of astrocytes in homeostasis of glutamate and GABA during physiological and pathophysiological conditions. *Advances in Molecular and Cell Biology.* vol 31, pp. 461-474.

Shetty, M, Ismail-Beigi, N, Loeb, JN, Ismail-Beigi, F, 1993. Induction of GLUT1 mRNA in response to inhibition of oxidative phosphorylation. *Am. J. Physiol* 265, C1224-C1229.

Shibuki, K, Gomi, H, Chen, L, Bao, S, Kim, JJ, Wakatsuki, H et al., 1996. Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. *Neuron* 16, 587-599.

Shirayama, Y, Muneoka, KT, Iwata, M, Ishida, H, Hazama, G, Kawahara, R, 2005. Pregnenolone and dehydroepiandrosterone administration in neonatal rats alters the

immunoreactivity of hippocampal synapsin I, neuropeptide Y and glial fibrillary acidic protein at post-puberty. *Neuroscience* 133, 147-157.

Sielaff, TD, Hu, MY, Rollins, MD, Bloomer, JR, Amiot, B, Hu, WS, Cerra, FB, 1995. An anesthetized model of lethal canine galactosamine fulminant hepatic failure. *Hepatology* 21, 796-804.

Simpson, IA, Appel, NM, Hokari, M, Oki, J, Holman, GD, Maher, F et al., 1999. Blood-brain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J. Neurochem* 72, 238-247.

Smith, KE, Borden, LA, Hartig, PR, Branchek, T, Weinshank, RL, 1992. Cloning and expression of a glycine transporter reveal colocalization with NMDA receptors. *Neuron* 8, 927-935.

Sobel, RA, DeArmond, SJ, Forno, LS, Eng, LF, 1981. Glial fibrillary acidic protein in hepatic encephalopathy. An immunohistochemical study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 40, 625-632.

Spahr, L, Butterworth, RF, Fontaine, S, Bui, L, Therrien, G, Milette, PC et al., 1996. Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms. *Hepatology* 24, 1116-1120.

Starzl, T, Bernhard, V, Benvenuto, R, Cortes, N, 1959. A new method for one-stage hepatectomy for dogs. *Surgery* 46, 880-886.

Strauss, G, Hansen, BA, Kirkegaard, P, Rasmussen, A, Hjortrup, A, Larsen, FS, 1997. Liver function, cerebral blood flow autoregulation, and hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 25, 837-839.

- Strauss, G, Hansen, BA, Knudsen, GM, Larsen, FS, 1998. Hyperventilation restores cerebral blood flow autoregulation in patients with acute liver failure. *J. Hepatol.* 28, 199-203.
- Strauss, GI, Moller, K, Larsen, FS, Kondrup, J, Knudsen, GM, 2003. Cerebral glucose and oxygen metabolism in patients with fulminant hepatic failure. *Liver Transpl.* 9, 1244-1252.
- Suarez, I, Bodega, G, Arilla, E, Fernandez, B, 1996. Long-term changes in glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase immunoreactivities in the supraoptic nucleus of portacaval shunted rats. *Metab Brain Dis.* 11, 369-379.
- Suarez, I, Bodega, G, Arilla, E, Rubio, M, Villalba, R, Fernandez, B, 1992. Different response of astrocytes and Bergmann glial cells to portacaval shunt: an immunohistochemical study in the rat cerebellum. *Glia* 6, 172-179.
- Subbalakshmi, GY, Murthy, CR, 1985. Isolation of astrocytes, neurons, and synaptosomes of rat brain cortex: distribution of enzymes of glutamate metabolism. *Neurochem Res.* 10, 239-250.
- Sulyok, E, Vajda, Z, Doczi, T, Nielsen, S, 2004. Aquaporins and the central nervous system. *Acta Neurochir. (Wien.)* 146, 955-960.
- Summerskill, WH, Wolpert, E, 1970. Ammonia metabolism in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 23, 633-639.
- Suyama, Y, Hirayama, C, 1988. Serum indole and skatole in patients with various liver diseases. *Clin. Chim. Acta* 176, 203-206.
- Swain, M, Butterworth, RF, Blei, AT, 1992. Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 15, 449-453.

Taha, C, Tsakiridis, T, McCall, A, Klip, A, 1997. Glucose transporter expression in L6 muscle cells: regulation through insulin- and stress-activated pathways. *Am. J. Physiol* 273, E68-E76.

Takahashi, H, Koehler, RC, Brusilow, SW, Traystman, RJ, 1990. Glutamine synthetase inhibition prevents cerebral oedema during hyperammonemia. *Acta Neurochir. Suppl* (Wien.) 51, 346-347.

Takahashi, H, Koehler, RC, Brusilow, SW, Traystman, RJ, 1991. Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am. J. Physiol* 261, H825-H829.

Takahashi, M, Wakabayashi, K, 2004. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.* 95, 475-480.

Takatsuna, Y, Chiba, T, Adachi-Usami, E, Kaneko, T, 1994. Distribution of phosphate-activated glutaminase-like immunoreactivity in the retina of rodents. *Curr. Eye Res.* 13, 629-637.

Taketani, S, Kohno, H, Furukawa, T, Tokunaga, R, 1995. Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. *J. Biochem. (Tokyo)* 117, 875-880.

Taniguchi, M, Yamashita, T, Kumura, E, Tamatani, M, Kobayashi, A, Yokawa, T et al., 2000. Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 78, 131-137.

Tao-Cheng, JH, Nagy, Z, Brightman, MW, 1987. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J. Neurosci.* 7, 3293-3299.

Terblanche, J, Hickman, R, 1991. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig. Dis. Sci.* 36, 770-774.

Therrien, G, Giguere, JF, Butterworth, RF, 1991. Increased cerebrospinal fluid lactate reflects deterioration of neurological status in experimental portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 6, 225-231.

Tofteng, F, Jorgensen, L, Hansen, BA, Ott, P, Kondrup, J, Larsen, FS, 2002. Cerebral microdialysis in patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* 36, 1333-1340.

Tofteng, F, Larsen, FS, 2004. The effect of indomethacin on intracranial pressure, cerebral perfusion and extracellular lactate and glutamate concentrations in patients with fulminant hepatic failure. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 24, 798-804.

Traber, P, DalCanto, M, Ganger, D, Blei, AT, 1989. Effect of body temperature on brain edema and encephalopathy in the rat after hepatic devascularization. *Gastroenterology* 96, 885-891.

Traber, PG, Dal Canto, M, Ganger, DR, Blei, AT, 1987. Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology* 7, 1272-1277.

Trey, C, Davidson, CS, 1970. The management of fulminant hepatic failure. *Prog. Liver Dis.* 3, 282-298.

Tunon, MJ, Sanchez-Campos, S, Garcia-Ferreras, J, Alvarez, M, Jorquera, F, Gonzalez-Gallego, J, 2003. Rabbit hemorrhagic viral disease: characterization of a new animal model of fulminant liver failure. *J. Lab Clin. Med.* 141, 272-278.

- Urabe, T, Hattori, N, Nagamatsu, S, Sawa, H, Mizuno, Y, 1996. Expression of glucose transporters in rat brain following transient focal ischemic injury. *J. Neurochem* 67, 265-271.
- van Haasteren, G, Li, S, Muda, M, Susini, S, Schlegel, W, 1999. Calcium signalling and gene expression. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 19, 481-492.
- Vannucci, SJ, Maher, F, Simpson, IA, 1997. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21, 2-21.
- Vannucci, SJ, Seaman, LB, Vannucci, RC, 1996. Effects of hypoxia-ischemia on GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in immature rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 16, 77-81.
- Vaquero, J., Bélanger, M., Côté, J., and Butterworth, R. F, 2004a. Mild hypothermia attenuates acetaminophen-induced hepatic necrosis in mice: therapeutic implications. *Hepatology* 38, 62A (Abstract)
- Vaquero, J, Chung, C, Blei, AT, 2004b. Cerebral blood flow in acute liver failure: a finding in search of a mechanism. *Metab Brain Dis.* 19, 177-194.
- Vizuite, ML, Venero, JL, Vargas, C, Ilundain, AA, Echevarria, M, Machado, A, Cano, J, 1999. Differential upregulation of aquaporin-4 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema. *Neurobiol. Dis.* 6, 245-258.
- Von Hosselin, C, Alzheimer, A, 1912. Ein Beitrag zur klinik und pathologischen anatomie der Westphal-Strumpellschen pseudosklerose. *Z. Neurol. Psychiatr.* 8, 183-209.

Voorhies, TM, Ehrlich, ME, Duffy, TE, Petito, CK, Plum, F, 1983. Acute hyperammonemia in the young primate: physiologic and neuropathologic correlates. *Pediatr. Res.* 17, 970-975.

Voutsinos-Porche, B, Bonvento, G, Tanaka, K, Steiner, P, Welker, E, Chatton, JY et al., 2003. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37, 275-286.

Walz, W 2004. Potassium homeostasis in the brain at the organ and cell level. *Advances in Molecular and Cell Biology*. vol 31, pp. 595-609.

Walz, W, 1989. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog. Neurobiol.* 33, 309-333.

Wargovich, MJ, Satterfield, W, Price, RE, Stephens, LC, Coghlan, L, 1991. Hepatic pathology of the colon carcinogen, azoxymethane, in Hanford-Moore miniature pigs. *J. Comp Pathol.* 105, 271-278.

Warskulat, U, Gorg, B, Bidmon, HJ, Muller, HW, Schliess, F, Haussinger, D, 2002. Ammonia-induced heme oxygenase-1 expression in cultured rat astrocytes and rat brain in vivo. *Glia* 40, 324-336.

Warter, JM, Brandt, C, Marescaux, C, Rumbach, L, Micheletti, G, Chabrier, G et al., 1983. The renal origin of sodium valproate-induced hyperammonemia in fasting humans. *Neurology* 33, 1136-1140.

Weissman, BA, Brandeis, R, Gilat, E, Cohen, G, Alkalay, D, Rabinovitz, I et al., 2004. Monitoring drug-induced neurodegeneration by imaging of peripheral benzodiazepine receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1025, 584-589.

Weissman, BA, Raveh, L, 2003. Peripheral benzodiazepine receptors: on mice and human brain imaging. *J. Neurochem* 84, 432-437.

Wendon, JA, Harrison, PM, Keays, R, Williams, R, 1994. Cerebral blood flow and metabolism in fulminant liver failure. *Hepatology* 19, 1407-1413.

Wertheimer, E, Sasson, S, Cerasi, E, Ben Neria, Y, 1991. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 2525-2529.

Wolff, JR, Ivo Chao, T. 2004. Cytoarchitectonics of non-neuronal cells in the central nervous system. *Advances in Molecular and Cell Biology*. vol 31, pp. 1-51.

Woods, MJ, Williams, DC, 1996. Multiple forms and locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Biochem. Pharmacol.* 52, 1805-1814.

Yao, H, Sadoshima, S, Fujii, K, Kusuda, K, Ishitsuka, T, Tamaki, K, Fujishima, M, 1987. Cerebrospinal fluid lactate in patients with hepatic encephalopathy. *Eur. Neurol.* 27, 182-187.

Yurdaydin, C, Gu, ZQ, Nowak, G, Fromm, C, Holt, AG, Basile, AS, 1993. Benzodiazepine receptor ligands are elevated in an animal model of hepatic encephalopathy: relationship between brain concentration and severity of encephalopathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 565-571.

Yurdaydin, C, Herneth, AM, Puspok, A, Steindl, P, Singer, E, Ferenci, P, 1996. Modulation of hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced acute liver failure by serotonin antagonists. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 667-671.

Yurdaydin, C, Walsh, TJ, Engler, HD, Ha, JH, Li, Y, Jones, EA, Basile, AS, 1995. Gut bacteria provide precursors of benzodiazepine receptor ligands in a rat model of hepatic encephalopathy. *Brain Res.* 679, 42-48.

Zafra, F, Aragon, C, Olivares, L, Danbolt, NC, Gimenez, C, Storm-Mathisen, J, 1995. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J. Neurosci.* 15, 3952-3969.

Zan, Y, Haag, JD, Chen, KS, Shepel, LA, Wigington, D, Wang, YR et al., 2003. Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nat. Biotechnol.* 21, 645-651.

Zeller, K, Duelli, R, Vogel, J, Schrock, H, Kuschinsky, W, 1995. Autoradiographic analysis of the regional distribution of Glut3 glucose transporters in the rat brain. *Brain Res.* 698, 175-179.

Zeller, K, Rahner-Welsch, S, Kuschinsky, W, 1997. Distribution of Glut1 glucose transporters in different brain structures compared to glucose utilization and capillary density of adult rat brains. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 17, 204-209.

Zhou, BG, Norenberg, MD, 1999. Ammonia downregulates GLAST mRNA glutamate transporter in rat astrocyte cultures. *Neurosci. Lett.* 276, 145-148.

Ziegler, A, Hagmann, J, Kiefer, B, Nagamine, Y, 1990. Ca^{2+} potentiates cAMP-dependent expression of urokinase-type plasminogen activator gene through a calmodulin- and protein kinase C-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 265, 21194-21201.

Ziegler, DR, Innocente, CE, Leal, RB, Rodnight, R, Goncalves, CA, 1998. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Res.* 23, 1259-1263.

Zimmerman, HJ, 1986. Effects of alcohol on other hepatotoxins. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 10, 3-15.

Zonta, M, Angulo, MC, Gobbo, S, Rosengarten, B, Hossmann, KA, Pozzan, T, Carmignoto, G, 2003. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* 6, 43-50.

Zwingmann, C, Chatauret, N, Leibfritz, D, Butterworth, RF, 2003. Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [H-C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* 37, 420-428.

Zwingmann, C, Chatauret, N, Rose, C, Leibfritz, D, Butterworth, RF, 2004. Selective alterations of brain osmolytes in acute liver failure: protective effect of mild hypothermia. *Brain Res.* 999, 118-123.

Zwingmann, C, Desjardins, P, Hazell, A, Chatauret, N, Michalak, A, Butterworth, RF, 2002. Reduced expression of astrocytic glycine transporter (Glyt-1) in acute liver failure. *Metab Brain Dis.* 17, 263-273.